

KASVUALUSTAN HORMONITASOJEN JA KAS- VUNAIKAISEN KARAISUN VAIKUTUS VERSO- MISEEN JA JUURTUMISEEN *IN VITRO* KOL- MELLA RUUSULAJIKKEELLA

Heidi Pirttinen

Opinnäytetyö
Marraskuu 2010

Laboratorioalan koulutusohjelma
Tekniikka ja Liikenne



JYVÄSKYLÄN AMMATTIKORKEAKOULU
JAMK UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES



| | | |
|---|----------------------------------|---|
| Tekijä(t) PIRTTINEN, Heidi | Julkaisun laji Opinnäytetyö | Päivämäärä 17.11.2010 |
| | Sivumäärä 71 | Julkaisun kieli Suomi |
| | Luottamuksellisuus () saakka | Verkojulkaisulupa myönnetty (X) |
| Työn nimi KASVUALUSTAN HORMONITASOJEN JA KASVUNAIKAISEN KARAISUN VAIKUTUS VERSOMISEEN JA JUURTUMISEEN <i>IN VITRO</i> KOLMELLA RUUSULAJIKKEELLA | | |
| Koulutusohjelma Laboratorioalan koulutusohjelma | | |
| Työn ohjaaja(t) SALO, Esa, yliopettaja | | |
| Toimeksiantaja(t) Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus MTT, Laukaan yksikkö UOSUKAINEN, Marjatta, vanhempi tutkija | | |
| <p>Tiivistelmä</p> <p>Työn tavoitteena oli optimoida kolmelle ruusulajikkeelle lisäys- ja juurrutusaloja huonon versomisen ja juurtumisen parantamiseksi <i>in vitro</i>. Tarhapimpinellaruusu Tove Jansson ja tarhakurtturuu- su Sointu lisääntyvät ja juurtuvat heikosti <i>in vitro</i>, joten niille pyrittiin löytämään kelvollinen kasvu- alusta. Tarhaharisoniruusu Williams' Double Yellow käytettiin alustakokeissa verrokina, koska se lisääntyy ja juurtuu helposti. Ruusujen menekki on hyvä, joten tuotanto olisi saatava mahdollisim- man tehokkaaksi. Samalla tutkittiin eri hormonitasojen sekä kasvun aikaisen karaisun vaikutusta ruusujen versomiseen ja juurtumiseen.</p> <p>Kirjallisuuden perusteella valittiin lisäyskokeeseen alustoiksi Quoirin-Lepoivren alusta sekä MTT:lla jo käytössä ollut G-suola-alusta. Molemmissa alustoissa sokerina käytettiin sakkaroosia, MTT:lla G- alustassa on käytetty fruktoosia. Alustat kiinteytettiin agarilla. Hormoneina käytettiin BAP:a ja gib- berelliinia neljänä erilaisena yhdistelmänä. Kutakin ruusua oli 20 versoa kullakin alustalla (8 alustaa), kaikkiaan yhteensä 480 versoa. Ruusuja lisättiin erlenmeyerissa kolme kertaa (Sointua neljästi) neljän viikon välein. Korkkina käytettiin ilmastointireiällistä foliokorkkia versojen karaistumiseksi. Mikrolisäyksestä selvisi versoja niin vähän, ettei juurrutusaloitakokeita voitu tehdä. Kaikki versot juurrutettiin muovirasioissa samanlaisella alustalla käyttäen hormonina 2,0 mg/l IAA:a.</p> <p>Gibberelliinista ruusut eivät tuntuneet pitävän. Parhaaksi lisäysalustaksi nousi G-suola-alusta, jossa oli 1,0 mg/l BAP:a eikä lainkaan gibberelliinia. Jokaisella lisäyskerralla käytetty ilmastointikorkki saattoi karaista versoja liikaa. Kaikki versot olivat liian pieniä juurrutusalustalle laitettaessa ja suurin osa niistä kuoli alustalle. Yksikään verso ei muodostanut juuria ja useiden versojen tyvet ja ympäröi- vä agar olivat mustuneet kasvin muodostamien fenolien vaikutuksesta. Eri mallinen kasvatusastia ja eri sokeri saattaisivat parantaa ruusujen versomista. Optimaalinen BAP-pitoisuus löytynee pitoisuu- den 1,0 mg/l lähistöltä. Jatkossa Quoirin-Lepoivren alustaa ei kannata enää testata eikä myöskään käyttää gibberelliinia.</p> | | |
| Avainsanat (asiasanat) Mikrolisäys, ruusut, <i>in vitro</i> -menetelmä, kasvualustat, juurrutusaloit | | |
| Muut tiedot | | |



| | | |
|--|--|---|
| Author(s) PIRTTINEN, Heidi | Type of publication Bachelor's Thesis | Date 17112010 |
| | Pages 71 | Language Finnish |
| | Confidential () Until | Permission for web publication (X) |
| Title THE EFFECT OF HORMONE LEVELS AND DESENSITIZATION DURING CULTIVATION ON SHOOT PROLIFERATION AND ROOTING <i>IN VITRO</i> OF THREE ROSE CULTIVARS | | |
| Degree Programme Laboratory Sciences | | |
| Tutor(s) SALO, Esa, Senior lecturer | | |
| Assigned by MTT Agrifood Research Finland UOSUKAINEN, Marjatta, senior scientist | | |
| <p>Abstract</p> <p>The aim of this study was to develop the proliferation and rooting media suitable for Rosa Pimpinellifolia 'Tove Jansson' and Rosa Rugosa 'Sointu'. These cultivars have serious difficulties in shoot proliferation and rooting <i>in vitro</i>. The cultivar 'Williams' Double Yellow' proliferates and forms roots easily, thus it was used in comparison to estimate the suitability of the media for roses in general. The markets for these roses are vast, therefore an attempt was made to enhance the production in MTT. Also the effect of desensitization during cultivation and the hormone levels were studied.</p> <p>Literature was studied closely and Quoirin-Lepoivre's medium and the G-salt medium used by MTT were chosen for proliferation. The sugar in both media was saccharose, at MTT fructose has been used in the G-salt medium. The media were solidified with agar and as hormones BAP and GA₃ were used in four different combinations. There were eight media and 20 shoots per each media per rose cultivar; 480 shoots altogether. They were proliferated in Erlenmeyer flasks three times (Sointu four times) in four-week cycles. The flasks were sealed with air-conditioned foil. After micropropagation, there were so few shoots alive that the rooting experiment could not be done. All shoots were rooted in the same medium using IAA 2.0 mg/l.</p> <p>GA₃ was not suitable for the rose cultivars. The best medium for proliferation was the G-salt medium containing 1.0 mg/l BAP and no GA₃. To use the air-conditioned cap every time may have been too much of a stress for the cultivars. All shoots were too small when transferred to the rooting medium and most of them died during rooting. None of them formed any roots and phenolic compounds had blackened the foot and the surrounding agar of most shoots.</p> | | |
| Keywords Micropropagation, roses, nutrient medium, MTT, shoot proliferation and rooting of roses | | |
| Miscellaneous | | |

SISÄLTÖ

| | |
|---|----|
| LYHENTEET JA SANASTO | 4 |
| 1 OPINNÄYTETYÖN LÄHTÖKOHDAT | 5 |
| 2 KIRJALLISUUDEN KAUTTA TULOSSIIN | 6 |
| 3 RUUSUJEN HISTORIAA..... | 16 |
| 4 KOKEESSA KÄYTETYT RUUSULAJIKKEET | 17 |
| 5 ALUSTAVALINNAT | 21 |
| 6 PISTOKASLISÄYS | 22 |
| 7 MIKROLISÄYS ELI SOLUKKOVILJELY | 23 |
| 7.1 Pääpiirteet | 23 |
| 7.2 Aloitukset..... | 25 |
| 7.2.1 Verson kärki- ja hankasilmuviljely | 25 |
| 7.2.2 Meristeemiviljely | 25 |
| 7.2.3 Jälkisilmujen viljely..... | 26 |
| 7.2.4 Kallusviljelmät | 26 |
| 7.3 Mikrolisätyjen versojen juurrutus | 26 |
| 8 ONGELMIA MIKROLISÄYKSEN AIKANA JA SEN JÄLKEEN | 27 |
| 8.1 Fenolihdisteet | 27 |
| 8.2 Viljelmän kontaminoituminen..... | 28 |
| 8.3 Vesisolukkoisuus..... | 29 |
| 8.4 Etyleenä | 30 |
| 9 KASVATUSALUSTAN YHDISTEET | 31 |
| 9.1 Makroravinteet | 31 |
| 9.2 Mikroravinteet..... | 33 |

| | |
|--|----|
| 9.3 Vitamiinit..... | 37 |
| 9.4 Sokeri..... | 38 |
| 9.5 Muut lisäaineet | 39 |
| 9.6 Alustan ulkopuoliset kasviin vaikuttavat tekijät | 40 |
| 10 KASVUNSÄÄTEET ELI KASVIHORMONIT | 41 |
| 10.1 Auksiinit..... | 41 |
| 10.2 Sytokiniinit | 42 |
| 10.3 Gibberelliinit | 43 |
| 11 ALUSTAKOKEEN SUORITUS | 44 |
| 11.1 Alustat | 44 |
| 11.2 Kasvit | 46 |
| 12 KOKEEN TULOKSET JA POHDINTA | 51 |
| LÄHTEET | 56 |
| LIITTEET | 58 |
| Liite 1. Kirjallisuudesta etsityt alustat..... | 58 |
| Liite 2. Juurrutetut versot alustan ja ruusun mukaan | 64 |
| Liite 3. Juurrutusalustan koostumus..... | 66 |
| Liite 4. Murashige-Skoog (MS)-alustan koostumus..... | 67 |
| Liite 5. Kartat koeasetelmista ruusuittain..... | 68 |
| Liite 6. Reagenssit..... | 71 |
| KUVIOT | |
| KUVIO 1. Versojen määrä alustoittain, Williams' Double Yellow | 10 |
| KUVIO 2. Versojen määrä alustoittain, Sointu..... | 13 |
| KUVIO 3. Versojen määrä alustoittain, Tove Jansson | 15 |
| KUVIO 4. Sointu -ruusu..... | 18 |
| KUVIO 5. Tove Jansson -ruusu..... | 19 |
| KUVIO 6. Williams' Double Yellow -ruusu | 20 |
| KUVIO 7. Soinnun verso hormonittoman välikasvatusalustan jälkeen | 46 |

| | |
|---|----|
| KUVIO 8. Ruusujen lisääminen laminaarikaapissa | 47 |
| KUVIO 9. Koeasetelma kasvatushuoneessa, Williams' Double Yellow | 48 |
| KUVIO 10. Koeasetelma kasvatushuoneessa, Sointu ja Tove Jansson | 49 |

TAULUKOT

| | |
|--|----|
| TAULUKKO 1. Quoirin-Lepoivre-alustan koostumus | 6 |
| TAULUKKO 2. G-suola-alustan koostumus | 7 |
| TAULUKKO 3. Alustojen hormonipitoisuudet ja värikoodit | 8 |
| TAULUKKO 4. Lisääntyminen ja kuolleisuusprosentit, Williams' Double Yellow | 9 |
| TAULUKKO 5. Lisääntyminen ja kuolleisuusprosentit, Sointu | 12 |
| TAULUKKO 6. Lisääntyminen ja kuolleisuusprosentit, Tove Jansson | 14 |
| TAULUKKO 7. Alustojen paremmuusjärjestys tuottavuuden perusteella ... | 52 |

LYHENTEET JA SANASTO

| | |
|-----------------|---|
| 2,4-D | Kasvihormoni 2,4-dikloorifenoksietikkahappo, (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), synteettinen auksiini |
| 2iP | Kasvihormoni, N–isopentenyyliaminopuriini (engl. 6–(γ,γ-dimethylallylamino)purine), luonnollinen sytokiniini |
| Autotrofinen | Yhteyttävä eliö, omavarainen eliö, joka ei käytä ravinnokseen muita eliöitä tai niiden jätteitä |
| B2-turve | Vaaleaa rahkaturvetta, joka sisältää biologisesti aktiivisia kasvi tautien leviämistä estäviä ja kasvin tervettä kasvua edistäviä aineita |
| BAP | Kasvihormoni 6-bentsoeaminopuriini (6-benzylaminopurine), synteettinen sytokiniini |
| Heterotrofinen | Toisenvarainen eliö |
| IBA | Kasvihormoni indolivoihappo (indole-3-butyric acid), synteettinen auksiini |
| <i>In vitro</i> | "lasissa" eli esimerkiksi koeputkessa. Irrotettuna alkuperäisestä eliöstä tai organismista |
| <i>In vivo</i> | Elävässä organismissa |
| Kallus | Aktiivisesti jakautuva epäorganisoitunut kudoks, muodostuu erilaisista sekä erilaistumattomista soluista. Kehittyy yleensä kasviin tullessaan haavaan tai muuhun vammaan. |
| KIBA | juurritushormoni, indoli-3-voihapon kaliumsuola (indole-3-butyric acid potassium salt) |
| Kinetiini | Kasvihormoni, synteettinen sytokiniini |
| Metabolinen | Aineenvaihdunnallinen, aineenvaihduntaan liittyvä |
| Morfologinen | Muotoon ja rakenteeseen liittyvä |
| NAA | Kasvihormoni, naftaleenietikkahappo (α-naphthaleneacetic acid), synteettinen auksiini |
| pCPA | Kasvihormoni, parakloorifenoksietikkahappo, synteettinen auksiini |
| Zea | Kasvihormoni, zeatiini, luonnollinen sytokiniini. |

1 OPINNÄYTETYÖN LÄHTÖKOHDAT

Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus MTT on Suomen johtava maatalous- ja elintarviketutkimusta sekä maatalouden ympäristötutkimusta tekevä laitos, joka toimii maa- ja metsätalousministeriön alaisuudessa. MTT:lla on toimipaikkoja kaikkiaan 14 paikkakunnalla ympäri Suomea. MTT:n kasvintuotannon tutkimuksen Laukaan toimipaikassa tuotetaan varmennettuja valiotaimia ja ydinkasveja. Lisäksi siellä säilytetään Suomen kansalliseen kasvigeenivaraohjelmaan valittuja puutarhakasveja kryosäilytysmenetelmällä eli säilyttämällä kasvien silmuja pakastettuna nestetypessä -196 °C:ssa.

MTT Laukaassa lisätään ruusuja mikrolisäyksellä lasipurkeissa eli *in vitro* -lisäystekniikalla sekä pistokaslisäyksellä. Mikrolisäyksessä ruusut ovat olleet jo vuodesta 1985 (Pöyhönen 2010). Vuonna 2009 valiotaimituotannossa oli 19 eri ruusukantaa. Suomalainen ruusunjalostusohjelma alkoi vuonna 1992 Helsingin yliopistossa ja jatkuu nykyisin säätiörahoituksella. Jalostusohjelmasta tulivat ensimmäiset kolme lajiketta valiotaimituotantoon vuonna 2008.

Opinnäytetyössä pyrittiin parantamaan mikrolisäyksen tuottavuutta optimoimalla tarhapimpinellaruusu 'Tove Janssonille' ja tarhakurturuusu 'Soinnulle' sopivia kasvu- ja juurrutusaloja. Lajikkeet ovat uusia, ne tulivat valiotaimituotantoon vuonna 2008. Ruusuja halutaan runsaasti emo- ja jatkokasvatus- taimiksi. Suuren kysynnän vuoksi myös tuotannon olisi oltava tehokasta mutta ongelmana etenkin uusilla lajikkeilla on niiden heikko lisääntyminen ja juurtuminen *in vitro*. Tove Janssonin ja Soinnun vertailukohteena käytettiin helposti lisääntyvää ja juurtuvaa tarhaharisoninruusulajiketta 'Williams' Double Yellow'. Sen avulla pystyttiin havaitsemaan koealustojen mahdollinen sopivuus yleensäkin ruusuille. Kokeeseen valittiin ja modifioitiin alustat kirjallisuudesta löydettyistä ruusuille käytetyistä alustoista.

2 KIRJALLISUUDEN KAUTTA TULOSSIIN

Alustakokeita varten etsittiin kirjallisuudesta viitteitä ruusujen lisäykseen (ks. liite 1, taulukko 1) ja juurrutukseen (ks. liite 1, taulukko 2) käytetyistä kasvu-alustoista. Lisäyskokeissa päädyttiin käyttämään kahta erilaista suolakoostumusta, Quoirin-Lepoivren alustaa ja MTT:lla käytettyä G-suola-alustaa sekä neljää erilaista hormonyhdistelmää. Quoirin-Lepoivre-alustan koostumus käy ilmi taulukosta 1, G-suola-alustan koostumus taulukosta 2 sekä hormonyhdistelmät taulukosta 3.

TAULUKKO 1. Quoirin-Lepoivre-alustan koostumus

| Makroravinteet | Kantaliuos [g/l] | Alusta [g/l] |
|--|--------------------------|----------------------|
| NH ₄ NO ₃ | 16,5 | 0,40 |
| KNO ₃ | 19,0 | 1,81 |
| KH ₂ PO ₄ | 17,0 | 1,35 |
| Ca(NO ₃) ₂ * 4 H ₂ O | 2,00 | 0,20 |
| FeSO ₄ * 7 H ₂ O | 0,780 | 0,04 |
| Na ₂ EDTA | | |
| Mg ₂ SO ₄ * 7 H ₂ O | 37,0 | 3,59 |
| Mikroravinteet | Kantaliuos [mg/l] | Alusta [mg/l] |
| MnSO ₄ * 4 H ₂ O | 1000 | 10,0 |
| ZnSO ₄ * 7 H ₂ O | 100 | 1,00 |
| CuSO ₄ * 5 H ₂ O | 3,00 | 0,03 |
| H ₃ BO ₃ | 100 | 1,00 |
| KI | 1,00 | 0,01 |
| Vitamiinit | Kantaliuos [mg/l] | Alusta [mg/l] |
| Tiamiini-HCl | 100 | 1,0 |
| Nikotiinihappo | 100 | 1,0 |
| Ca-pantotenaatti | 50 | 0,5 |
| Biotiini | 10 | 0,1 |
| Riboflaviini | 10 | 0,1 |

TAULUKKO 2. G-suola-alustan koostumus

| Makroravinteet | Kantaliuos [g/l] | Alusta [g/l] |
|--|-------------------------|-------------------------|
| NH ₄ NO ₃ | 33,000 | 1,650 |
| KNO ₃ | 5,0000 | 0,250 |
| KH ₂ PO ₄ | 5,0000 | 0,250 |
| Ca(NO ₃) ₂ * 4 H ₂ O | 20,000 | 1,000 |
| FeSO ₄ * 7H ₂ O Na ₂ EDTA | 0,7800 | 0,039 |
| MgSO ₄ * 7 H ₂ O | 20,000 | 0,200 |
| Mikroravinteet | Kantaliuos [g/l] | Alusta [g/l] |
| H ₃ BO ₃ | 0,6200 | 6,2 * 10 ⁻³ |
| NaMoO ₄ * 2 H ₂ O | 0,0250 | 2,5 * 10 ⁻⁴ |
| CoCl ₂ * 6 H ₂ O | 0,0025 | 2,5 * 10 ⁻⁵ |
| KI | 0,0830 | 8,3 * 10 ⁻⁴ |
| CuSO ₄ * 5 H ₂ O | 0,0025 | 2,5 * 10 ⁻⁵ |
| ZnSO ₄ * 7 H ₂ O | 0,8600 | 8,6 * 10 ⁻³ |
| MnSO ₄ * 4 H ₂ O | 2,2300 | 22,3 * 10 ⁻³ |
| Vitamiinit | Kantaliuos [g/l] | Alusta [g/l] |
| Nikotiinihappo | 0,0500 | 5,0 * 10 ⁻⁴ |
| Tiamiini | 0,1000 | 1,0 * 10 ⁻³ |
| Pyridoksiini | 0,0500 | 5,0 * 10 ⁻⁴ |
| Glysiini | 0,2000 | 2,0 * 10 ⁻³ |

TAULUKKO 3. Alustojen hormonipitoisuudet ja värikoodit

| Väri | Suolat | BAP [mg/l] | GA ₃ [mg/l] |
|-------------|--------|---------------|---------------------------|
| Harmaa | Q-L | 1,0 | 0 |
| Keltainen | Q-L | 1,0 | 1,0 |
| Vihreä | Q-L | 2,5 | 1,0 |
| Punainen | Q-L | 5,0 | 1,0 |
| Musta | G | 1,0 | 0 |
| Valkoinen | G | 1,0 | 1,0 |
| Sininen | G | 2,5 | 1,0 |
| Raidallinen | G | 5,0 | 1,0 |

Kokeessa oli käytössä kahdeksan erilaista alustaa jokaista ruusua kohti ja versoja joka alustalla 20. Selvyyden vuoksi alustat merkittiin värikoodeilla, ja hormoneina käytettiin BAP:a ja gibberelliinia (ks. värikoodit ja hormonipitoisuudet taulukko 3). Ruusuja viljeltiin erlenmeyer-kolveissa, jolloin kolveja ja ruusun versoja koko kokeessa oli yhteensä 480 lisäyskertaa kohti. Lisäyskokeissa tutkittiin alustan eri hormonitasojen vaikutusta ruusujen versomiseen. Lisäyksessä käytettiin ilmastointireiällistä foliokorkkia ja tutkittiin samalla kasvunaikaisen karaisun vaikutusta ruusujen kasvuun ja versomiseen. Lisäyskokeiden jälkeen oli tarkoitus tehdä juurrutusluskokeita mutta versojen vähyyden vuoksi kaikki versot juurrutettiin samanlaisella juurrutusluskalla teemmättä erillisiä juurrutuskokeita.

Ruusuja lisättiin kolme kertaa neljän viikon välein. Sointua lisättiin neljästi, koska sille jouduttiin käyttämään hormonitonta välikasvatusluskaa pituuskasvun edistämiseksi. Sointu teki paljon uusia mutta lyhyitä hankaversoja yhteen tuppaseen. Versomuodostus oli jo suorastaan liiallista, josta päätellen alustassa oli Soinnulle liian paljon hormonia. Soinnun versot kasvoivat erittäin tiheässä, jolloin niiden määrää oli mahdotonta laskea. Siksi versoja yritettiin

pidentää väli-alustalla, jolla ne kasvoivatkin pituutta mutta eivät siltikään riittävästi juurrutusta silmällä pitäen.

Williams' Double Yellow'n versomäärä ei muuttunut radikaalisti koko lisäyksen aikana. Se ei tosin lisääntynyt niin runsaasti kuin oli oletettu mutta kuten taulukosta 4 nähdään, kuolleisuuskasvuun ei ollut suuri, korkeimmillaan alle 32 prosenttia. Williams' Double Yellow'n suhteellisen tasaisena pysynyttä versomäärää havainnollistaa hyvin kuvio 1.

TAULUKKO 4. Lisääntyminen ja kuolleisuusprosentit, Williams' Double Yellow

| TTA-580 Williams Double Yellow | | 1. lisäysjako | | | | Tässä vaiheessa laitettu kaikkiin 20 | | |
|--------------------------------|--------|---------------|--------|----------|--------------|--------------------------------------|---------|-------------|
| 20.4.-14.5. | Harmaa | Keltainen | Vihreä | Punainen | Musta | Valkoinen | Sininen | Raidallinen |
| Elossa | 20 | 20 | 19 | 19 | 20 | 20 | 20 | 19 |
| Kuollut | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Tyhjiä | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ylimääräisiä | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 2 | 0 |
| Uusia eteenpäi | 20 | 20 | 19 | 19 | 20 | 20 | 20 | 19 |
| Kuolleisuus | 0 % | 0 % | 5 % | 5 % | 0 % | 0 % | 0 % | 5 % |
| 2. lisäysjako | | | | | | | | |
| 14.5.-4.6. | Harmaa | Keltainen | Vihreä | Punainen | Musta | Valkoinen | Sininen | Raidallinen |
| Elossa | 18 | 20 | 17 | 13 | 20 | 20 | 20 | 15 |
| Kuollut | 2 | 0 | 2 | 6 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| Tyhjiä | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Home/pöpö | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ylimääräisiä | 10 | 6 | 0 | 0 | 8 | 6 | 2 | 0 |
| Uusia eteenpäi | 20 | 20 | 20 | 12 | 20 | 20 | 20 | 17 |
| Kuolleisuus | 0 % | 0 % | 11 % | 32 % | 0 % | 0 % | 0 % | 21 % |
| 3. lisäysjako | | | | | | | | |
| 4.6.-8.7. | Harmaa | Keltainen | Vihreä | Punainen | Musta | Valkoinen | Sininen | Raidallinen |
| Elossa | 20 | 18 | 14 | 11 | 19 | 19 | 16 | 13 |
| Kuollut | 0 | 2 | 6 | 1 | 1 | 1 | 4 | 4 |
| Tyhjiä | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Home/pöpö | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 home kasvi | 0 | 0 | 0 |
| Juurtumaan | 20 | 18 | 14 | 8 | 18 | 19 | 16 | 13 |
| Kuolleisuus | 0 % | 10 % | 30 % | 8 % | 10 % | 5 % | 20 % | 24 % |
| Juurrutus | | | | | | | | |
| 8.7.-28.7. | Harmaa | Keltainen | Vihreä | Punainen | Musta | Valkoinen | Sininen | Raidallinen |
| Elossa | 20 | 14 | 8 | 2 | 2 | 3 | 2 | 0 |
| Kuollut | 0 | 4 | 6 | 6 | 16 | 16 | 14 | 13 |
| Home/pöpö | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kuolleisuus | 0 % | 22 % | 43 % | 75 % | 89 % | 84 % | 88 % | 100 % |

* Kuolleisuus-%: (Kuolleet + homeiset)/kasvamaan laitettut

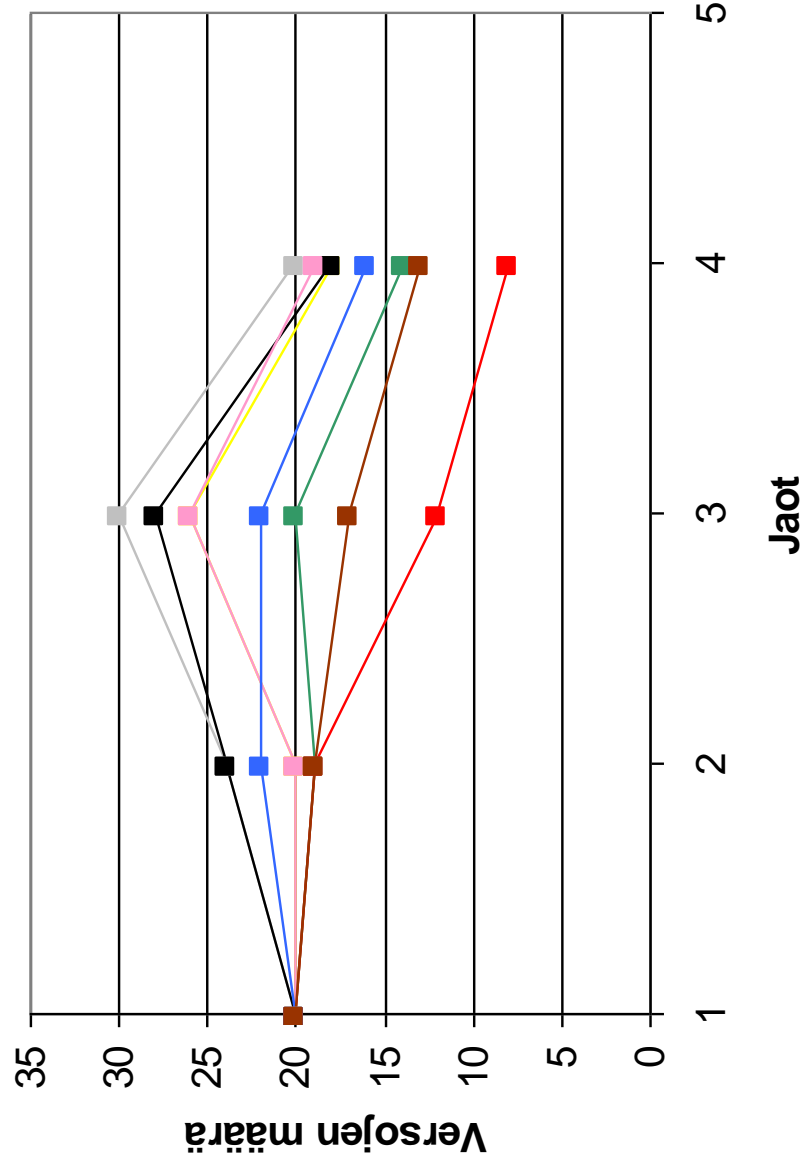
Valkoisessa alustassa 12 vanhaa versoa kasvupistettä 5-1848 ja 16 uutta. 8 vanhaa 5-1849 ja 4 uutta sekä 6 ylimääräistä.

§ Valkoisessa alustassa 15 kpl 5-1848 ja 4 kpl 5-1849

▣ Juurrutetut laskettu elossa oleviksi, jos versossa on ollut vihreää jonkin verran.

Juurrutettujen tyvet mustia, lehdet kuivaneet, elävät versot liian pieniä koulittavaksi turpeelle.

Williams Double Yellow TTA-580



KUVIO 1. Versojen määrä alustoittain, Williams' Double Yellow

Soinnulle Quoirin-Lepoivren alusta ei tuntunut sopivan, jo toisen lisäysjaon jälkeen versomäärä oli pudonnut alle puoleen, kun G-alustoilla oli jokaisella vielä miltei kaikki 20 versoa elossa (ks. taulukko 5). Soinnun versomäärä vaihteli reilummin kuin Williams' Double Yellow'n (vrt. kuvio 2 ja kuvio 1). Positiivista oli kuitenkin, että versomäärä lisääntyi edes muutamalla alustalla kunnolla, joka näkyi tosin vasta välikasvatusalustan jälkeen.

TAULUKKO 5. Lisääntyminen ja kuolleisuusprosentit, Sointu

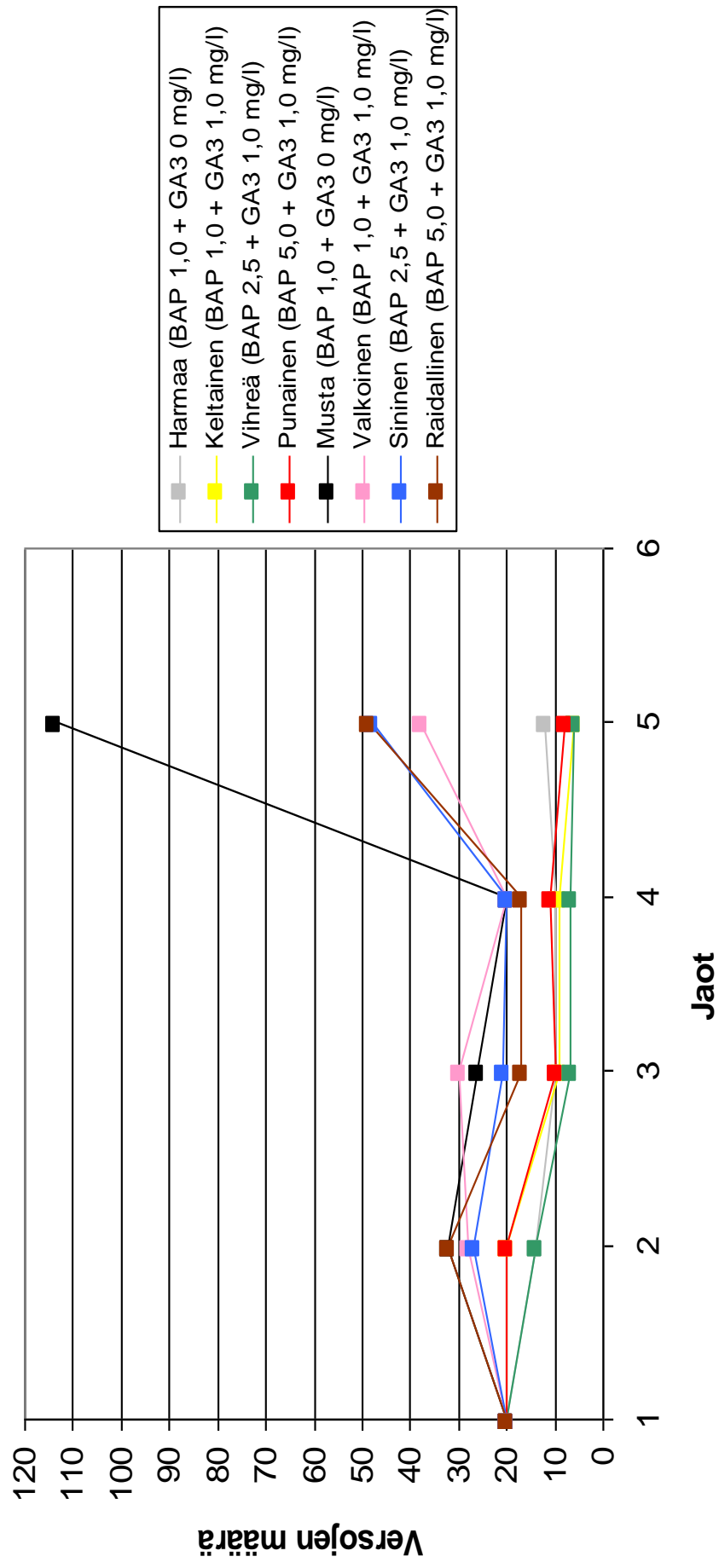
| TTA-603 Sointu | | 1. lisäysjako | | | | | | | Tässä vaiheessa laitettu kaikkiin 20 | |
|-----------------|--------|---------------|--------------|--------------|-------|-----------|---------|-------------|--------------------------------------|---|
| 20.4.-14.5. | Harmaa | Keltainen | Vihreä | Punainen | Musta | Valkoinen | Sininen | Raidallinen | | |
| Elossa | 14 | 20 | 14 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | | |
| Kuollut | 6 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| Tyhjiä | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| Ylimääräisiä | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 | 8 | 7 | 12 | | |
| Uusia eteenpäin | 14 | 20 | 14 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | | |
| Kuolleisuus-% | 30 % | 0 % | 30 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | | * |
| | | | | | | | | | | |
| 2. lisäysjako | | | | | | | | | | |
| 14.5.-5.6. | Harmaa | Keltainen | Vihreä | Punainen | Musta | Valkoinen | Sininen | Raidallinen | | |
| Elossa | 10 | 8 | 7 | 10 | 18 | 18 | 20 | 17 | | |
| Kuollut | 4 | 12 | 7 | 10 | 2 | 2 | 0 | 3 | | |
| Tyhjiä | 6 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| Home/pöpö | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| Ylimääräisiä | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 10 | 1 | 0 | | |
| Uusia eteenpäin | 10 | 9 | 7 | 10 | 20 | 20 | 20 | 17 | | |
| Kuolleisuus | 29 % | 60 % | 50 % | 50 % | 0 % | 0 % | 0 % | 15 % | | |
| | | | | | | | | | | |
| 3. lisäysjako | | | | | | | | | | |
| 5.6.-8.7. | Harmaa | Keltainen | Vihreä | Punainen | Musta | Valkoinen | Sininen | Raidallinen | | |
| Elossa | 10 | 9 | 7 | 7 | 20 | 20 | 20 | 17 | | |
| Kuollut | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| Tyhjiä | 10 | 11 | 13 | 10 | 0 | 0 | 0 | 3 | | |
| Home/pöpö | 0 | 0 | 1 home tyhjä | 1 home kasvi | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| Välialustalle | 10 | 9 | 7 | 11 | 20 | 20 | 20 | 17 | | |
| Kuolleisuus | 0 % | 0 % | 0 % | 40 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | | |

* Kuolleisuus-%: (Kuolleet + homeiset)/kasvamaan laitettut

| TTA-603 Sointu Välialusta | | | | | | | | |
|---------------------------|--------|--------------|--------------|----------|-------|-----------|---------|-------------|
| 8.7.-23.7. | Harmaa | Keltainen | Vihreä | Punainen | Musta | Valkoinen | Sininen | Raidallinen |
| Elossa | 10 | 7 | 7 | 6 | 20 | 20 | 20 | 17 |
| Kuollut | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tyhjiä | 10 | 11 | 13 | 9 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Home/pöpö | 0 | 2 pöpökasvia | 1 pöpö tyhjä | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Juurtumaan | 12 | 6 | 6 | 8 | 114 | 38 | 48 | 49 |
| Kuolleisuus | 0 % | 22 % | 0 % | 45 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % |
| | | | | | | | | |
| Juurrutus | | | | | | | | |
| 23.7.-3.8. | Harmaa | Keltainen | Vihreä | Punainen | Musta | Valkoinen | Sininen | Raidallinen |
| Elossa | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kuollut | 12 | 6 | 6 | 8 | 114 | 38 | 48 | 49 |
| Kuolleisuus | 100 % | 100 % | 100 % | 100 % | 100 % | 100 % | 100 % | 100 % |

* Juurrutetut laskettu elossa oleviksi, jos versossa on ollut vihreää jonkin verran.

Sointu TTA-603



KUVIO 2. Versojen määrä alustoittain, Sointu

Tove Janssonin versomäärä vähentyi tasaisesti koko lisäyskokeen aikana. Koeruusuille ei saatu optimoitua kunnollista lisäysalustaa, jolla ne tuottaisivat runsaasti uusia versoja. Lisäystulokset tosin viittaavat siihen, että gibberelliinia ruusujen lisäykseen ei kannata käyttää. Lienee myös mahdollista, että aina-kaan Tove Jansson -lajike ei välttämättä menesty lainkaan solukkoviljelyssä. Kuten taulukosta 6 ja kuviosta 3 nähdään, se ei ole juurikaan lisääntynyt mis-sään vaiheessa millään alustalla vaan sen versomäärä on pudonnut jatkuvasti.

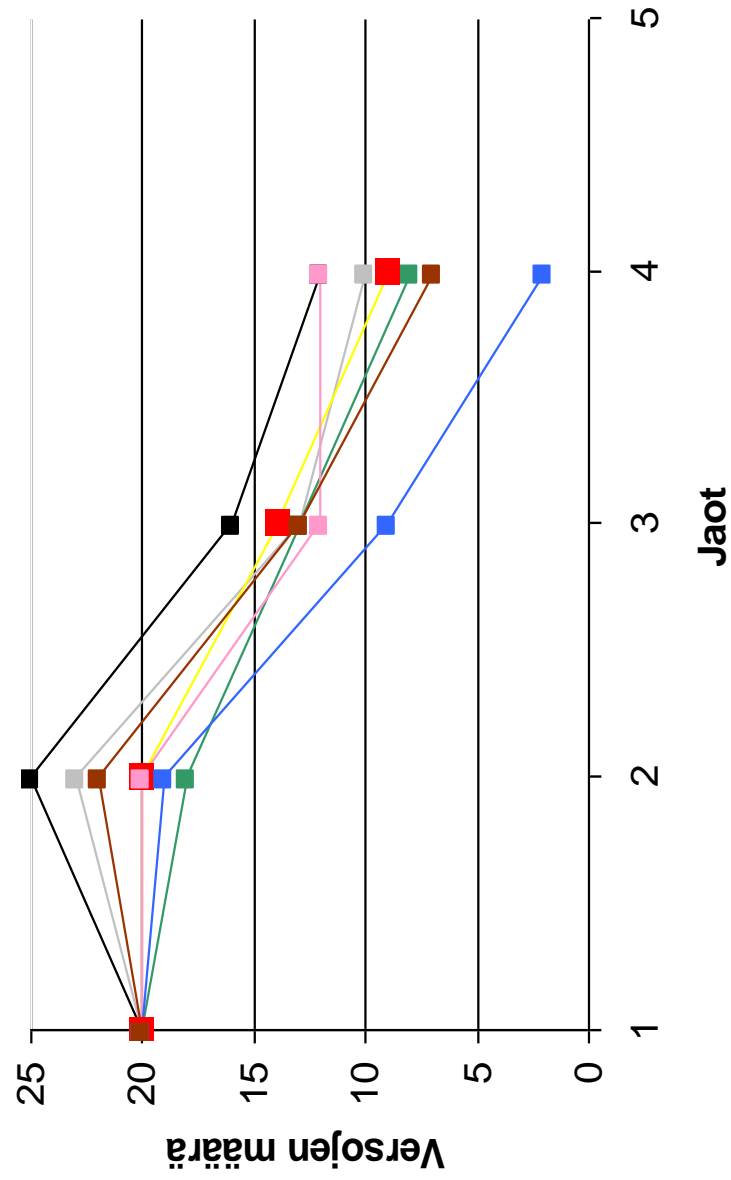
TAULUKKO 6. Lisääntyminen ja kuolleisuusprosentit, Tove Jansson

| TTA-601 Tove Jansson | | 1. koealusta | | Tässä vaiheessa laitettu kaikkiin 20 | | | | | |
|----------------------|--------|--------------|---------------|--------------------------------------|--------------|-----------|--------------|-------------|---|
| 20.4.-13.5. | Harmaa | Keltainen | Vihreä | Punainen | Musta | Valkoinen | Sininen | Raidallinen | |
| Elossa | 20 | 20 | 18 | 20 | 20 | 20 | 19 | 20 | |
| Kuollut | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | |
| Tyhjiä | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Ylimääräisiä | 3 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 2 | |
| Uusia eteenpäin | 20 | 20 | 18 | 20 | 20 | 20 | 19 | 20 | |
| Kuolleisuus-% | 0 % | 0 % | 10 % | 0 % | 0 % | 0 % | 5 % | 0 % | * |
| 2. koealusta | | | | | | | | | |
| 13.5.-5.6. | Harmaa | Keltainen | Vihreä | Punainen | Musta | Valkoinen | Sininen | Raidallinen | |
| Elossa | 17 | 15 | 13 | 15 | 16 | 13 | 9 | 13 | |
| Kuollut | 3 | 5 | 4 | 5 | 4 | 7 | 10 | 7 | |
| Tyhjiä | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | |
| Home/pöpö | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Uusia eteenpäin | 13 | 14 | 13 | 14 | 16 | 12 | 8 | 13 | |
| Kuolleisuus | 15 % | 25 % | 28 % | 25 % | 20 % | 35 % | 53 % | 35 % | |
| 3. koealusta | | | | | | | | | |
| 5.6.-8.7. | Harmaa | Keltainen | Vihreä | Punainen | Musta | Valkoinen | Sininen | Raidallinen | |
| Elossa | 13 | 14 | 10 | 9 | 16 | 12 | 3 | 9 | |
| Kuollut | 0 | 0 | 3 | 5 | 0 | 0 | 4 | 4 | |
| Tyhjiä | 7 | 6 | 7 | 6 | 4 | 8 | 12 | 7 | |
| Home/pöpö | 0 | 0 | 2 tyhjää home | 0 | 1 home tyhjä | 0 | 1 pöpö kasvi | 0 | |
| Juurtumaan | 10 | 9 | 8 | 9 | 12 | 12 | 4 | 7 | |
| Kuolleisuus | 0 % | 0 % | 23 % | 36 % | 0 % | 0 % | 63 % | 31 % | |
| Juurrutus | | | | | | | | | |
| 8.7.-28.7. | Harmaa | Keltainen | Vihreä | Punainen | Musta | Valkoinen | Sininen | Raidallinen | |
| Elossa | 6 | 0 | 4 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | |
| Kuollut | 4 | 9 | 4 | 7 | 11 | 12 | 3 | 7 | |
| Home/pöpö | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Kuolleisuus | 40 % | 100 % | 50 % | 78 % | 92 % | 100 % | 75 % | 100 % | |

* Kuolleisuus-%: (Kuolleet + homeiset)/kasvamaan laitetut

□ Juurrutetut laskettu elossa oleviksi, jos versossa on ollut vihreää jonkin verran.

Tove Jansson TTA-601



KUVIO 3. Versojen määrä alustoittain, Tove Jansson

Koska lisäysjakojen jälkeen versoja oli jäljellä kustakin ruususta verrattain vähän (ks. liite 2), päätettiin juurrutusalustakokeen sijaan juurruttaa kaikki versot samalla alustalla. Alustaksi valittiin yksinkertainen G-suolapohjainen alusta (ks. taulukko 2), jossa hormonina käytettiin IAA:a (ks. liite 3). Kunkin ruusun eri alustoilta laitettiin elossa olleet versot juurtumaan omiin muovirasioihinsa. Kaikki versot tosin olivat periaatteessa liian pieniä juurrutukseen, mikä saattoi olla osasyynä suureen kuolleisuuteen juurrutusvaiheessa (ks. taulukot 4–6). Juurtumiseen vaikuttaa aina myös kasvin lisäysalusta. Lisäksi ruusut erittivät runsaasti fenolia alustaansa, jolloin niiden tyvet ja myös ympäröivä agar oli mustunut. Fenoli on kasville myrkyllistä, joten versojen kuoleminen on saattanut johtua myös fenoleista.

3 RUUSUJEN HISTORIAA

Nykyisten ruusujen kehitys perustuu kolmeen lajiryhmään. Ruusuilla on pitkä ja monimutkainen historia, joten niiden lajittelukaan ei ole yksinkertaista. Mellbyen mukaan ensimmäiseen ryhmään kuuluvat itäaasialaiset, lähinnä kiinalaiset ja japanilaiset lajit sekä niiden läheisimmät jälkeläiset. Itä-Aasian rannikko-seuduilta kotoisin olevalta luonnonvaraiselta kurtturehtiruusulta, *Rosa Rugosa*lta periytyvät hyvä talvenkestävyys ja kukinnan uusiutuminen yhdistyvät monissa ruusuissa vielä nykyäänkin. (Mellbye 1994–1995, 175.)

Toinen ryhmä on alkuperältään Etu-Aasiasta, pääasiassa Turkista ja Persiasta eli nykyisestä Iranista. Nykyruusujen oranssi ja keltainen väri periytyy persian-keltaruusulta, 'Persian Yellow'. Euroopassa on viljelty kauimmin etenkin ranskanruusua, jolla on lukemattomia jälkeläisiä sekä vanhoissa että uudemmissa ruusuissa. Tietävästi ne syntyivät Kaukasuksella, josta ne kulkeutuivat läntisen Aasian kauppateitä pitkin Etelä-Eurooppaan. (Mellbye 1994–1995, 175–176.)

Kolmanteen ryhmään lukeutuu eurooppalaisia ja joitakin amerikkalaisia lajeja. Mellbyen mukaan erityisen tärkeitä Pohjoismaissa ovat olleet omenaruusu,

Rosa Rubiginosa/Rosa Eglanteria, sekä juhannusruusu, Rosa Pimpinellifolia/Rosa Spinosissima. Euroopan ensimmäinen ruusutarha eli rosarium perustettiin 1800-luvun alussa Pariisin länsipuolella sijaitsevan Malmaisonin linnan pihalle. Rosariumissa oli sadoittain eri lajeja ja risteymiä ja näin ollen se oli ruusujen kehityksen kannalta korvaamattoman arvokas. (Mellbye 1994–1995, 176.)

Alangon mukaan ruusulajeja tunnetaan nykyisin 100–200, Euroopassa niistä kasvaa 45 lajia. Suomessa luonnonvaraisina kasvaa kuusi ruusulajia sekä useita villiintyneitä lajeja. Ruusulajikkeita on vähintään 15 000, joista läheskään kaikki eivät ole enää viljelyssä; vuosittain tulee kuitenkin yhä uusia lajikkeita markkinoille. (Alanko 2003, 127.)

Ruusun kiulukoita eli marjoja käytetään teollisuudessa ruusunmarjakeiton valmistukseen. Kiulukat ovat olleet etenkin pohjoisessa erittäin tärkeitä C-vitamiinin lähteitä. Ruusua on käytetty sekä kauneudenhoitoon että lääkkeeksi vuosisatojen ajan jo ennen kuin siitä tuli yleinen koristekasvi. Terälehtien uskottiin vaikuttavan nuorentavasti kylpyveteen lisättynä tai suoraan iholle laitettuna ja erilaisilla ruusukeitoksilla parannettiin maksa-, keuhko- ja vatsavaivoja. Varsinkin silmäsairauksiin ruusua pidettiin erittäin tehokkaana lääkkeenä. (Nilsson & Nilsson 1994, 11.)

4 KOKEESSA KÄYTETYT RUUSULAJIKKEET

Sointu

Sointu (ks. kuvio 4) on Rosa Rugosa -ryhmään kuuluva tarhakurturuusulajike. Se on Snow Pavementin ja R. polyantha -valioruusun risteytys vuodelta 1994, ja sen vaaleanpunertavat, puolikerrannaiset, tuoksuvat kukat ovat suurissa tertuissa. Sointu kukkii kesä-heinäkuussa ja toistaa kukintansa elosyyskuussa. Ruusupensas on kasvutavaltaan pyöreä ja tiheä ja kasvaa noin 1–1,2-metriseksi. (Hokka, Laamanen, Lahtonen, Pöyhönen & Uosukainen 2008, 41.)



KUVIO 4. Sointu -ruusu (Pöyhönen 2010. Kuvannut Peter Joy)

Tove Jansson

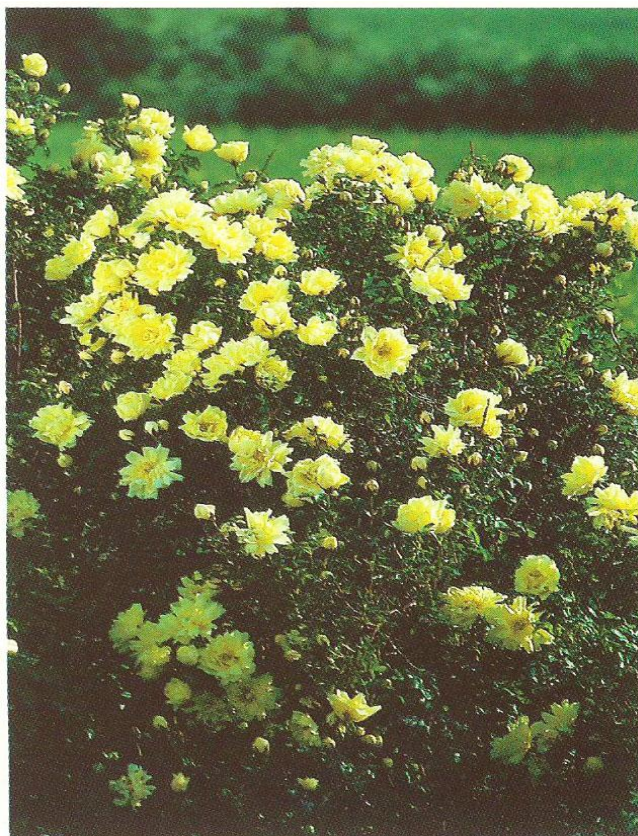
Rosa Pimpinellifolia -ryhmään kuuluva tarhapimpinellaruusu Tove Jansson (ks. kuvio 5) on Red Nellyn ja Poppiuksen risteytys vuodelta 1991. Se kukkii kesäkuussa suurehkoin, yksinkertaisin, tummanpunaisiin kukin. Red Nellyyn verrattuna Tove Jansson -pensaamun muoto on parempi ja vähäpiikkisempi sekä kukinta runsaampi ja näyttävämpi. (Hokka ym. 2008, 40.)



KUVIO 5. Tove Jansson -ruusu (Pöyhönen 2010. Kuvannut Peter Joy)

Williams' Double Yellow

Rosa Harisonii -ryhmään kuuluva tarhaharisoninruusu Williams' Double Yellow (ks. kuvio 6) on *R. foetida* x *R. pimpinellifolia* -risteytys, jota on kutsuttu myös nimillä Old Double Yellow Scots Rose ja Prince Charlie's Rose (Bean 1980, 204). Sen löysi ja ilmeisesti myös nimesi englantilainen John Williams vuonna 1828 (Gustavsson 1998, 68). Hokka ja muut (2008) kuvailevat Williams' Double Yellow'n olevan kukiltaan keltainen pensasruusu. Sen kukat ovat puolikerrannaiset, sitruunankeltaiset ja miellyttäväntuoksuiset. Pensas itsessään on matala, vain noin metrinen. (Mts. 43.)



KUVIO 6. Williams' Double Yellow -ruusu (Gustavsson 1998, 68)

Ruusujen kasvatus MTT:lla

MTT Laukaassa mikrolisättyjä ruusuja kasvatetaan laboratorion kasvatushuoneessa C alimmilla hyllyillä. Kasvit saavat huoneessa lisävaloa klo 16.00–08.00 välisenä aikana. Päiväaikaan huoneen lämpötila on + 20 °C ja yöllä + 19 °C. Tilanpuutteen vuoksi koerusuuni olivat kasvatushuoneessa X, jossa kasvuolosuhteet olivat samat kuin C-huoneessa. Muutamana päivänä X:n lämpötila ja valaistus vaihtelivat rajusti teknisen vian vuoksi. Huoneen ilmastointi oli epäkunnossa, joten lämpötilaa säädeltiin valaistuksella. Tämän takia lämpötila vaihteli +18...+25 °C:seen. Normaaaleissa olosuhteissa huoneen alimmilla hyllyillä koerusujeni kohdalla lämpötila oli +21,5 °C.

Ruusut lisääntyvät kehnosti agar-alustalla, joten niille olisi tärkeää löytää kunnollinen alusta, jossa ne kehittyisivät hyviksi ja normaaleiksi versoiksi. Ruusut pidettäisiin mielellään mikrolisäyksessä. Koska niiden menekki on hyvä, niitä

tarvitaan runsaasti, mutta pistokaslisäyksellä niitä saadaan lisättyä vain rajallinen määrä tiettyä aikana vuodesta. Lisäksi pistokaslisäys vie moninkertaisesti tilaa mikrolisäykseen verrattuna. Juurrutuksenkin kannalta olisi hyvä, että löytyisi ruusuille sopiva juurrutuslusto. Kasvien sopeutumista turpeelle voisi osittain helpottaa se, että niillä olisi juuret jo valmiina eikä niitä laitettaisi sinne suorajuurrutuksena.

5 ALUSTAVALINNAT

Georgen (1993, 947) mukaan ruusuille sopivin kasvualusta on Murashige-Skoog- eli MS-alusta (ks. liite 4) vuodelta 1962. Alusta tukee kasvin kasvua ja versojen lisääntymistä hyvin. Tutkijat ovat myöhemmin muunnelleet alustaa sen verran, että sen tiamiinihydrokloridipitoisuus on nostettu tasolle 0,5 mg/l ja nykyään tätä pitoisuutta käytetään hyvin yleisesti. Ruusujen lisäyksessä on käytetty myös suolakkoostumukseltaan laimeampaa Lloyd-McCownin WPM-alustaa. Näistä kahdesta selvästi käytetympi on kuitenkin MS-alusta.

Opinnäytetyössä tehtyä koetta varten etsittiin kirjallisuudesta yhteensä 12 viitettä lisäys- ja juurrutuslustoista, joita on käytetty ruusujen viljelyssä. Alustat taulukoitiin (ks. liite 1) ja niistä valittiin järkevimmät käytetyn ruusulajin sekä tulosten mukaan. Esimerkiksi miniruusuilla käytettyjä alustoja ei kannattanut ottaa kokeeseen mukaan, koska asiantuntijoiden mukaan miniruusut käyttäytyvät lisäyksessä erilailla kuin kokeessa käyttämäni lajikkeet. Jäljempänä kerrotaan tarkemmin vain kokeeseen otetuista alustoista.

Juurutuslustoista (ks. liite 1, taulukko 2) valittiin käytettäväksi Druartin kirsikka-alusta. Valles ja Boxus saavuttivat 11:tä Rosa hybrida -lajiketta viljellessään 100-prosenttisen juurtuvuuden kolmella lajikkeella tätä alustaa käyttäen. Nämä täydellisesti juurtuneet lajikkeet oli viljelty alustalla, jossa hormoneina oli 1,0 mg/l BAP:a sekä 1,0 mg/l IBA:a. Juurrutuksessa Valles ja Boxus pienensivät Druartin alustan makroravinteet puoleen, hormonina he käyttivät 3,0 mg/l IBA:a. (Valles & Boxus 1987, 611–617.)

Valles ja Boxus (1987, 613) havaitsivat jo 1,0 mg/l BAP:a olevan riittävä pitoisuus, jolla Rosa hybrida -lajikkeet lisääntyivät runsaasti. Heidän mukaansa ne sietivät jopa BAP-pitoisuuksia 5 - 7 mg/l. Lisääntyminen kiihtyi kovin, mutta versot jäivät pieniksi, jolloin ne tarvitsivat ehdottomasti ennen juurrutusta väli-alustan pituuskasvua varten. Druartin kirsikka-alustan lisäksi Valles & Boxus (1987, 611) mainitsevat Quoirin-Lepoivren suolakoostumuksen ja toteavat IBA:n pitoisuutena 0,1 mg/l vähentävän lisääntymistä. Heidän mukaansa BAP:a tarvitaan vähintään 1,0 mg/l hankaversojen kasvamiseksi, jota gibberelliini tuntuu tehostavan. Artikkelista jää kuitenkin epäselväksi, ovatko Valles ja Boxus käyttäneet Quoirin-Lepoivre-alustaa kokeessaan vai eivät. Alusta katsottiin kuitenkin hyödylliseksi ottaa mukaan lisäyskokeeseen.

Quoirin-Lepoivre -alusta on muunnelma Murashige-Skoog-alustasta (vrt. taulukko 1 ja liite 4). Jälkimmäiseen verrattuna sen ammoniumionikonsentraatio on pienempi, kalsiumkonsentraatiota on kasvatettu sekä kloori-ionit on poistettu käytännössä kokonaan. Tätä suolakoostumusta kannattaa käyttää, koska se suo mahdollisuuden vesisolukkoisuuden välttämiseen. Varsinkin ruusuille kloridi on todettu haitalliseksi. Quoirin-Lepoivre-alustan tarkempi koostumus saatiin selvitettyä muusta kirjallisuudesta (ks. tarkemmin Quoirin & Lepoivre 1977, 437-442; George 1993, 395, 404, 411).

6 PISTOKASLISÄYS

Pistokkaat otetaan hyvin voivasta ja kasvavasta emokasvista oksien latvaosista. Pistokkaaksi otetaan vain ruohomaista kasvia, liian puutunut ei kelpaa. Pistokkaaksi aiottu kasvin osa katkaistaan lehtihangan alapuolelta ja alin lehti sekä latva poistetaan. Hyvässä pistokkaassa tulisi olla kaksi lehteä poistettujen lehtien lisäksi.

Valmiit pistokkaat dipataan kymmenen sekunnin ajan liuoksessa, jossa on 100 mg/l juurrutushormonia KIBA (indoli-3-voihapon kaliumsuola) ja 50 mg/l boori-

happoa. Tämän jälkeen ne pistellään turpeelle. MTT:lla on käytössä B2-turve, jonka päälle laitetaan kaksi – kolme senttimetriä hiekkaa ja pistokkaat istutetaan siten, että niiden tyvi ulottuu turpeeseen saakka. Turve suihkutetaan homeenestoaineella ja pistokkaat peitetään muovihupulla noin kuukauden ajaksi. Niitä tuuletetaan eli karaistaan pikku hiljaa tuona aikana, ja kuukauden kuluessa pistokkaiden tulisi kehittää juuret.

Pistokkaiden kasvuun lähtö vaihtelee kasvilajeittain ja lajikkeittain, esimerkiksi ruusuilla jotkut lajikkeet kasvavat hyvin ja joidenkin kasvuun lähtö on tosi heikko. Kuten edellä käy ilmi, pistokaslisäys on hyvin työläs lisäystapa. Tällaisen makrolisäyksen tuottavuus on hyvin rajoittunut ja se on riippuvainen vuoden-aikojen vaihteluista. Siksi tekniikan tuottavuuden parantamiseksi on kehitetty mikrolisäystekniikat. (Collin & Edwards 1998, 124.)

7 MIKROLISÄYS ELI SOLUKKOVILJELY

7.1 Pääpiirteet

Collin ja Edwards (1998) summaavat mikrolisäyksen perustuvan steriilin kudoksen tuottamiseen, uuden kasvuston stimulointiin, nuorten kasvien nopeaan kasvuun, niiden juurtumiseen ja sopeutumiseen tavalliseen maahan. Tekniikat hyödyntävät viljellyn solukon sterilointia ja kalluksen uudistumista. (Mts. 124.)

Kasvien solukkoviljelyn perustana on kasvin totipotenssi eli jokaisen yksittäisen kasvisolun kyky kasvaa kokonaiseksi kasviksi, tarkentavat Haapala ja Niskanen (1992). Kasvisolut ovat näin ollen toisistaan riippumattomia. Solukkoviljelyssä soluja, solukoita ja kasvin osia viljellään steriileissä olosuhteissa irrallaan emokasvista. Kappaleita kasvatetaan alustalla, joka sisältää solukon elämäänsä tarvittavat aineet ja kaasumaisen hapen ja vedyn solukko saa kasvatustilassaan olevasta ilmasta. (Mts. 13.)

Collin ja Edwards (1998, 121) toteavat vegetatiivisella eli kasvullisella lisääntymisellä olevan suuri merkitys maa- ja metsätaloudelle sekä kasvinjalostukselle. Haapalan ja Niskasén (1992, 15) mukaan mikrolisäyksessä voidaan puhua kloonauksesta, koska kasvin vegetatiivisesta solukosta aloitetulla viljelmällä pystytään tuottamaan emokasviin nähden täsmälleen samanlaisia uusia yksilöitä. Se mahdollistaa yhtenäisen viljelykasvimateriaalin tuoton sekä koriste- ja hedelmäpuiden, vihannesten, marjakasvien ja metsän puiden lisäämisen. Vuosittaisen sadon lisäämiseen tarkoitetut menetelmät, risteyttäminen, valinta ja siementen tuottaminen, eivät sovellu puuvartisille perennoille, koska valinta voidaan tehdä vain perennan aikuisiässä, joka voi puilla olla jopa 40 vuotta. Näiden tapojen sijaan, valitut perennayksilöt lisätään vegetatiivisesti. (Collin & Edwards 1998, 121.)

Kasvullinen lisääntyminen tuottaa satunnaisesti poikkeavia yksilöitä, jotka yleensä hylätään tai käytetään hyödyksi, mikäli niillä on arvoa uutuutena. Poikkeavia yksilöitä aiheuttaa somaattinen mutaatio kasvin kärjessä ja se voi ilmentyä normaalista poikkeavan muotoisina lehtinä, erilaisena kukan muotona tai värinä sekä hedelmän erilaisena muotona, kokona tai värinä. (Collin & Edwards 1998, 121.)

Mikrolisäyksessä on kaikkiaan viisi eri vaihetta. Aloituvaiheessa emokasvin version silmuista otetut kasvupistesolut paisutetaan ravintoalustalla, jossa ne kasvavat pieniksi mikroversoiksi. Lisäsvaiheessa mikroversot siirretään version kasvua edistävillä aineilla terästetylle ravintoalustalle lisääntymään. Mikroversojen lehtihangoissa olevien silmujen kasvupisteet reagoivat ravintoalustaan ja uusien versojen kehittyminen alkaa jo muutamassa päivässä. Uusista versoista kehittyy versotuppaita, jotka viiden viikon kuluttua jaetaan yksittäisiksi versoiksi. Muodostuneita versoja eli mikropistokkaita kasvatetaan edelleen ravintoalustoilla ja jaetaan uudestaan viiden viikon kuluttua edellisestä jaosta.

7.2 Aloitukset

Collinin ja Edwardsin (1998, 125) mukaan mikrolisäystekniikoita on useita. Periaatteessa tekniikat eroavat toisistaan vain lähtökohdan eli viljelmän aloituksen perusteella (Laamanen & Nukari 2010). Esimerkiksi verson kärki- ja hankasilmujen viljely helpottaa kasvukloonien tuotantoon käytettyä *in vivo*-lisäystapaa (Collin & Edwards 1998, 125), jossa uusia kasveja tuotetaan elävissä organismeissa eli toisessa kasvissa.

7.2.1 Verson kärki- ja hankasilmuviljely

Verson kärki- ja hankasilmuviljelytekniikkaa käytetään kaupallisessa mikrolisäyksessä sen yksinkertaisuuden vuoksi. Kuten Collin ja Edwards (1998) toteavat, kärki- ja hankasilmuja otettaessa emokasvien tulee kasvaa tarmokkaasti ja olla tauti- ja tuholaisvapaita. Silmut eivät saa olla lepotilaisia eikä kasvilla saisi olla taustallaan pitkittynyttä vesi- tai ravinnestressiä. Verson kärjet ja alle 10 millimetriä pitkät hankasilmut irrotetaan ja pintasteriloidaan, jonka jälkeen ne laitetaan oikein päin runsaasti sytokiniinia sisältävälle alustalle. Kun hankavälien versot ovat kasvaneet noin 10–20 millimetrisiksi, ne poistetaan ja siirretään samanlaiselle tuoreelle kasvualustalle, jossa alkava uusi lisääntymissykli voi jatkua miltei loputtomiin. Tosin ajan myötä lisääntyminen saattaa heiketä ja tällöin joudutaan ottamaan uudet aloitukset. (Mts. 125-126.)

7.2.2 Meristeemiviljely

Kasvit kantavat usein erilaisia bakteereja, viruksia ja sieniä, jotka eivät saa siirtyä emokasveihin eivätkä klooneihin. Aivan kasvin kärki eli meristeemi, on vapaa kaikista infektoista. Kun 0,1–0,5 millimetriä pitkä kärkiosa irrotetaan ja käsitellään kuten hankasilmut, siitä saatavista klooneista suurin osa on tauti- vapaita yksilöitä. Meristeemitekniikkaa käytetään virusvapaiden mansikan emokasvien ja siemenperunoiden tuottamiseen. (Collin & Edwards 1998, 127.)

7.2.3 Jälkisilmujen viljely

Collinin ja Edwardsin (1998) mukaan ei-meristeemisolut muuttuvat meristeemisiksi soluiksi kasvualustassa olevien kasvunsääteiden ja kudoksen sisäisen ravinnon lisääntymisen johdosta. Nämä vaikuttavat yhdessä vahvistaen paikallisen solujen erilaistumisen kudoksen pinnalla. Näin syntyvät meristemoidit kehittyvät joko juureksi tai varreksi riippuen auksiinien ja sytokiniinien suhteesta alustassa. Elemen ensimmäistä kehitysvaihetta tai jopa alkion muodostumista vastaava meristemoidien synty tapahtuu kalluksessa ja vahingoittumattomassa kasvikudoksessa. Tunnetuimpia jälkisilmuista lisättäviä kasveja ovat saintpaulia, begonia ja gloxinia. (Mts. 127.)

7.2.4 Kallusviljelmät

Kallus on aktiivisesti jakautuvaa epäorganisoidunutta kudosta, joka muodostuu erilaistuneista sekä erilaistumattomista soluista. Kallus kehittyy yleensä kasviin tulleet haavaan tai muuhun vammaan. Kallusviljelmä voidaan aloittaa aikuisen kasvin nuoresta lehdestä. Lehti steriloidaan, leikataan osiksi ja laitetaan kiinteälle alustalle kasvamaan. Lehti kehittää leikkauskohtaansa kalluksen. Myös juuria, kasvin runkoa, lehtiä, kukkia ynnä muita kasvin osia voidaan käyttää kallusviljelmän aloitukseen. (Pierik 1987, 9, 213, 215.)

George, Hall ja De Klerk (2008) ovat todenneet, että mikrolisäysviljelmän aloitus on onnistunut, jos riittävä määrä versoista on säilynyt puhtaina eli kontaminoitumattomina ja jatkavat kasvuaan. Lisäyksessä ei siis pyritä sataprosenttiseen kasvuun vaan jatkotuotantoon. (Mts. 34.)

7.3 Mikrolisättyjen versojen juurrutus

Collinin ja Edwardsin (1998, 125-126) mukaan versot poistetaan mikrolisäysyklistä kun ne ovat 20 millimetriä pitkiä. Niitä voidaan stimuloida kaupallisella juurrutusjauheella juurten muodostumiseksi ja käsittelyn jälkeen versot asete-

taan tavalliseen juurrutusmultaan kuten tavalliset pistokkaat. Tätä suorajuurrutusta käytetään myös MTT:lla yhtenä juurrutuskeinona.

Vaihtoehtoisesti versojen juurtenmuodostus voidaan käynnistää myös *in vitro*. Versot siirretään lisäysalustoiltaan alustalle, jossa korkean sytokiniinipitoisuuden sijaan on paljon auksiinia, joko naftaleenietikkahappoa (NAA) tai indoli-voihappoa (IBA) pitoisuudessa 0,5–10,0 mg/l. Juurtenmuodostus saadaan näin nopeasti käyntiin, jonka jälkeen versot siirretään *in vitro* alustalle, jossa ei ole lainkaan kasvunsääteitä. Kun juurtuneet kasvit ovat 100 millimetriä pitkiä, ne voidaan myydä eteenpäin tai niistä voidaan ottaa pistokkaita. (Collin & Edwards 1998, 125-126.) Kasveja voidaan siis juurruttaa kolmella tavalla: suorajuurruttamalla mikrolisättyjä versoja, juurruttamalla *in vitro* tai käyttämällä pistokkaita.

Mikrolisättyjen kasvien siirtäminen turpeelle voi olla hyvinkin vaikeaa. Kasvit käyvät läpi voimakasta ja äkillistä stressiä niiden elinympäristön muuttuessa täydellisesti. *In vitro* -kasvatuksessa kasvi saa tarvitsemansa sokerin suoraan alustastaan ja sen valo-olosuhteita ja kaasujen vaihtoa säädellään. Turpeelle siirrettäessä kasvin on muututtava heterotrofisesta autotrofiseksi, joten yhteyttämisestä tulee sen elinehto. (Debergh & Zimmerman 1991, 80.) Kasvi muuttuu siis toisenvaraisesta omavaraiseksi, yhteyttäväksi eliöksi.

8 ONGELMIA MIKROLISÄYKSEN AIKANA JA SEN JÄLKEEN

Mikrolisäys on nykyään laajalti kaupallinen toimenpide, jolla pyritään tuottamaan tasalaatuisia kasveja mahdollisimman paljon ja mahdollisimman nopeasti. Tämän takia on alettu kiinnittää yhä enemmän huomiota kudosviljelyssä ilmeneviin ongelmiin ja niiden ratkaisemiseen. (Collin & Edwards 1998, 128.)

8.1 Fenoliyhdisteet

Collinin ja Edwardsin (1998, 128) mielestä fenoliyhdisteiden poistaminen on yksi suurimmista ongelmista etenkin puuvartisten perennojen viljelyssä. Kasvi tuottaa fenoleja itse ollessaan stressin alaisena, esimerkiksi joutuessaan aiemmista poikkeaviin vesi- tai ravinneolosuhteisiin. Esimerkiksi eksplantin irrottaminen emokasvista voi aiheuttaa fenoliyhdisteiden metabolian vilkastumisen, joka puolestaan aiheuttaa kasville yliherkkyyssreaktion (Debergh & Zimmerman 1991). Tällöin kasvi muun muassa saattaa vapauttaa rikkoutuneen solun sisällön, vaurioalueen ympäristön solut saattavat reagoida osoittamatta itse mitään oireita tai vauriota, tai saattavat jopa kuolla ennen aikojaan. Yleisesti ottaen fenolit hapettuvat helposti, jolloin niistä tulee itsestään oksidantteja. Hapettimina fenolit ovat kasville myrkyllisiä ja ne saattavat kiihdyttää hapetusprosesseja (mts. 5). Collin ja Edwards (1998) varoittavat, että fenolien muodostumista aiheuttavaa käsittelyä tulisi välttää. Fenolien vaikutuksia on yritetty vähentää useilla tavoilla. Fenolia voidaan osittain poistaa hapettamalla sitä polyfenolioksidaasilla kudosta poistettaessa. Hapetus puolestaan aiheuttaa versojen ruskettumista, joka vahingoittaa kasvikudosta paikallisesti ja saattaa inhiboida eli estää kasvin reagoimista kasvualustaan. (Mts. 128.)

Alustaan lisättynä aktiivihili tai polyvinyylipyrrolidoni adsorboivat eli sitovat pinnalleen fenoliyhdisteitä ja siten vähentävät kudoksen mustumista. Haittana aktiivihilien käytössä on, että se adsorboi myös kasvunsäätteitä. Vaihtoehtoisesti fenolit voidaan huuhtoa kasvista alustaan pesemällä kasvia juoksevassa vedessä 2–3 tuntia, inkuboimalla eli kasvattamalla kudosta steriilissä vedessä yön yli tai siirtämällä kasvia toistuvasti tuoreelle alustalle kahden tai kolmen päivän välein. (Collin & Edwards 1998, 128.)

8.2 Viljelmän kontaminoituminen

Ehjästä kasvikudoksesta aloitettujen viljelmien kontaminaation eli saastumisen syy on useimmiten kasvinsisäinen, toteavat Collin ja Edwards (1998). Kontaminaatio johtuu kasvinsisäisestä viruksesta, bakteerista tai sienestä ennemmin kuin huonosta aseptiikasta. Sisäiseen infekioon viittaa se, että infekcio tulee ilmi vasta viljelmän aloituksen myöhäisessä vaiheessa, useiden uusien lisäyksien jälkeen tai kudoksen ruskettumisena alustan koostumuksen vaih-

tamisesta huolimatta. Jos kasvin sisäinen infektiio on kontaminaation syynä, se johtuu mahdollisesti useammista erilaisista organismeista. (Mts. 129.)

Kasvinsisäinen kontaminaatio on syytä poistaa, jotta emokasvit eivät saastu eikä kontaminaatio siirry kloonien mukana eteenpäin. Kontaminaatio voi johtaa siihen, että lisätyt kasvit kasvavat huonosti tai jopa infektoivat muita lajeja. Sisäisen kontaminaation poistoon on olemassa useita tapoja. Kasvin meristeemistä eli aivan kärjestä voidaan aloittaa uusi viljelmä, jolla tuotettua kasvia käytetään jatkossa emokasvina. Kasvualustaan voidaan lisätä antibiootteja mutta kuten Collin ja Edwards (1998) varoittavat, myös niillä on kasvua inhiboiva vaikutus ja ne saattavat olla mutageenisia, joten niiden käyttö on oltava vain väliaikaista. Sienten aiheuttamaan kontaminaatioon voidaan käyttää benomyyliä, joka on laajasti muun muassa hedelmien ja marjojen homeentorjuntaan käytetty fungisidi eli sienten torjunta-aine. Virusinfektioiden hoitoon puolestaan käytetään viruksentorjunta-aineita tai lämpökäsittelyä; viljelmää pidetään 30–40 celsiusasteessa kahdesta kymmeneen viikkoa. (Mts. 130-131.)

8.3 Vesisolukkoisuus

Vesisolukkoisuus eli vesittyminen on yksi mikrolisäyksen harmillisista ongelmista. Puuvartisten ja ruohomaisten kasvien *in vitro* -lisäyksessä kasveihin vaikuttaa monia tekijöitä, jotka lopulta johtavat metabolisiin eli aineenvaihdunnallisiin ja morfologisiin eli muotoon ja rakenteeseen liittyviin häiriöihin (Debergh & Zimmerman 1991, 45). Collin ja Edwards (1998) toteavatkin mikrolisätyjen kasvien olevan ääriolosuhteissa kasvatusastioissaan. Suljetussa ilmatilassa alustan osmoottinen paine on hyvin suuri sakkaroosin ja makroravinteiden johdosta. Astiassa vallitseva hiilidioksidipitoisuus on paljon korkeampi kuin normaalisti ilmakehässä, lisäksi astiassa on erittäin runsaasti etyleeniä ja vesihöyryä. Korkea etyleenipitoisuus johtaa morfologisiin muutoksiin kuten varren paksuuntumiseen ja normaalista painovoimaisesta rungon, juurten ja lehtien asennoista poikkeaviin asentoihin. Korkea kosteus taas saattaa aiheuttaa vahaa lehtien pinnoille ja alustan korkea osmoottinen paine kudoshuutoksia, jolloin kudoshuute vaikuttaa paksuuntuneelta ja läpinäkyvältä. Tällaiset

vesittyneet epämääräisen muotoiset ja paksuuntuneet lehdet ja varret vaikeuttavat versojen sopeutumista tavalliseen multa-alustaan. Helpoin keino vesittymisen parantamiseen on alentaa astian pohjan lämpötilaa, jolloin vesihöyryn kondensaatio eli tiivistyminen parantuu ja se pitäytyy paremmin agarissa. Muut keinot vesittymisen vähentämiseksi vähentävät tai poistavat myös ammoniumin alustasta. (Mts. 131.)

8.4 Etyleeni

Pierikin (1987, 73) mukaan itse kasvin lisäksi sen muovinen kasvatusastia saattaa tuottaa etyleeniä. Hän on myös havainnut etyleenin muodostumisen olevan runsaampaa viljelmän ensimmäisinä viitenä päivänä kuin seuraavina kuutena - kymmenenä päivänä. Aikariippuvuuden lisäksi etyleenin tuotto näyttäisi riippuvan myös valoisuudesta: pimeässä syntyy Pierikin (1987) mukaan enemmän etyleeniä kuin valoisassa (mts. 74).

Etyleenin haittavaikutuksista mainittakoon se, että sen on todettu aiheuttavan kasvikudosten vanhenemista. De Proft, Van den Broek ja De Greef (*Acta Horticulturae* 212, 1987, 217-222) havaitsivat miniruusuilla tehdyissä kokeissaan, että etyleenin johtaminen kasvatusastian ilmakehään viiden viikon viljelyjakson aikana aiheutti klorofyllin vähenemisen. Lehtivihreän väheneminen puolestaan johti lehtien vanhenemiseen ja putoamiseen. De Proft ja muut (1987) huomasivat myös kasvin leikkauksen vaikuttavan sen etyleenin tuottoon. Kasvi tuotti etyleeniä leikkauskohdastaan minkä he huomasivat vähentyvän kun kasvi jaettiin yhtä aikaa kun siitä poistettiin lehtiä ja kasvupisteitä. Näin lehtien vanhentumista saatiin vähennettyä kun taas vesittyneisyys kasvoi eikä astian etyleenipitoisuus lehtien poistosta huolimatta kuitenkaan laskenut. Tämä osoittaa, että ainakaan miniruusujen tapauksessa etyleeni ei ehkä olekaan syyppää vesittymiseen. De Proft ja muut (1987) toteavat vesittymisen aiheuttajan kuitenkin olevan jokin lehdessä oleva aine.

Rosa hybridan lisäyksessä etyleenin on havaittu jopa voimistavan versojen lisääntymistä, kuitenkin niin, että etyleenin konsentraatio on ollut tietyssä määrin rajoitettu. Tässäkin tapauksessa versojen lisääntyneestä monistumisesta

huolimatta etyleeni esti niiden pituuskasvua. (George, Hall & De Klerk 1993/1996, 587.) Etyleenin toimintaa inhiboivia aineita käytetään sen biosynteesiä ehkäisevien aineiden sijasta silloin kun on oletettavissa, että etyleeni vaikuttaa soluviljelmän kasvuun tai morfogeneesiin. Tällaisia aineita ovat muun muassa hopeatiosulfaatti ja hopeanitraatti. (George ym. 2008, 457.)

9 KASVATUSALUSTAN YHDISTEET

Kasvien mikrolisäyksessä käytettävissä ravintoalustoissa on useita eri yhdisteitä. Pääasiassa kasvualustat koostuvat makro- ja mikroravinteista, raudasta, vitamiineista ja kasvunsäätteistä sekä hiilen lähteenä toimivasta sokerista. Alustoihin voidaan lisätä myös orgaanisen typen lähde mutta se ei ole suinkaan välttämätöntä. (Collin & Edwards 1998, 19–22.)

9.1 Makroravinteet

George ja muut (2008, 68) mainitsevat, että epäorgaaniset ravinteet lisätään alustaan suoloina, jolloin kasvi absorboi ravinteensa ioneina. Laimeissa vesiliuoksissa, kuten alustassa, suolat dissosioituvat eli hajoavat kationeiksi ja anioneiksi. Makroravinteisiin lukeutuvat typpi NO_3^- ja NH_4^+ –muodoissa, fosfori PO_4^- –muodossa, kalium, rikki SO_4^- –muodossa, kalsium sekä magnesium (Collin & Edwards 1998, 19).

Typpi, rikki ja kalsium

Jos vapaita ammoniumioneja on liikaa, ne saattavat Georgen ja muiden mukaan olla kasville jopa myrkyllisiä ja saattavat lisätä etyleenin tuotantoa kokonaisissa kasveissa. Alustassa on kuitenkin hyvä olla typpeä molemmissa muodoissa, sekä NO_3^- että NH_4^+ -ioneina, koska useimmat ehjät kasvit, kukokset ja elimet käyttävät typpeä tällöin tehokkaammin ja kasvavat nopeammin. Eri sokereihin sitoutuneet fosfaattiryhmät tarjoavat energiaa solun hengitykseen ja fotosynteesiin eli yhteyttämiseen. Proteiineihin sitoutunut fosfaatti taas säätelee niiden aktiivisuutta. Kasvi absorboi fosforin alustastaan ortofos-

faattianioneina $\text{H}_2\text{PO}_4^{4-}$ ja HPO_4^{2-} , ja käyttää sen täysin hapettuneessa PO_4^{3-} - muodossa. Mikäli liuenneen fosfaatin konsentraatio on kovin suuri, kasvu voi hidastua johtuen mahdollisesti siitä, että kalsium ja jotkut mikroelementit saostuvat liuksesta ja/tai niiden käyttö vähenee. (George ym. 2008, 71-73, 85.)

Etenkin typpi ja rikki ovat sekä rakenteellisesti että funktionaalisesti tärkeitä tekijöitä yleisesti proteiinisynteesissä. Fosforin ohella ne ovat oleellisia myös nukleotidien synteesissä. (Collin & Edwards 1998, 19.) Georgerin ja muiden mukaan typpeä löytyy myös klorofylleista eli viherhiukkasista. Rikkiä kasvi käyttää lipidisynteesissä ja proteiinien rakenteen säätelyssä muodostaen rikkisiltoja S-S. Se myös toimii ligandina eli liittyy rauta-, sinkki- ja kupari-ioneja metalloproteiineihin ja entsyymeihin. Rikki on välttämätön elementti, koska sen puutos johtaa proteiinisynteesin vajaukseen. Tällöin kasveista tulee kankeita, hauraita ja ohutvartisia. Kalsiumin tehtävänä taas on anionien tasapainottaminen kasvilla. Se myös linkittää biologisia molekyylejä yhteen sekä on mukana solukalvojen ja soluseinien välilamellin rakenteessa ja fysiologisissa ominaisuuksissa. Monet kasvin entsyymit ovat riippuvaisia kalsiumista, esimerkiksi viljeltyjen kasvisolujen selluloosasynteesi ei tapahdu ilman sitä. Kalsium toimii myös kofaktorina estäen fosfaatin saostumisen ja varmistaen magnesiumionien häiriöttömän toiminnan. Kalsiumin puutos taas aiheuttaa huonoa juurten kasvua sekä kärkilehtien reunojen mustumista ja rullaantumista, jonka seurauksena verson kasvu lakkaa ja verson kärki kuolee. Etenkin versoviljelmissä tämä yleensä lisäysjakojen jälkeen tapahtuva kärjen nekroosi eli kuoleminen on havaittu joskus vesittymisen kanssa yhtä aikaa. (George ym. 2008, 68, 88-89.)

Kalium

Makroravinteista kalium toimii kationina solun laajentumisessa säädellen nestejännitystä. Se toimii myös kofaktorina ja sen ionit neutraloivat sytoplasman eli soluliman tuottamia orgaanisia anioneja, joten ne stabiloivat solun pH:ta ja osmoottista potentiaalia eli sitä, miten vesimolekyylit siirtyvät solukalvon läpi. Kaliumin puutteen on havaittu aiheuttavan vesittymistä sekä vähentävän fosfaattiabsorptiota. (George ym. 2008, 86-87.)

Magnesium

Makroravinteisiin kuuluva magnesium on Georgen ja muiden (2008, 88) mukaan klorofyllimolekyylin oleellinen rakenneos. Magnesiumia tarvitaan useiden entsyymien toimintaan, etenkin niiden, jotka liittyvät fosfaatin siirtoon. Sitä tarvitaan myös ATP-synteesissä ja se toimii kaliumin tavoin kationina tasapainottaen ja neutraloiden anioneja ja orgaanisia happoja. Collin ja Edwards (1998,19) lisäävät magnesiumin tehtäviin vielä sen toimimisen entsyymikofaktorina ja kalvojen yhtenäistäjänä. Magnesiumsulfaattia MgSO_4 lisätään usein alustaan ainoana sekä magnesiumin että sulfaatin lähteenä (George ym. 2008, 88). Edellä mainittuja makroravinteita käytetään yleensä pitoisuuksissa $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l eli mM. (Collin & Edwards 1998, 19.)

9.2 Mikroravinteet

Mikroravinteita käytetään suhteellisen pieninä pitoisuuksina, $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol/l (μM), tarkentavat Collin ja Edwards (1998,20). Niihin lukeutuvat mangaani, sinkki, boori, kupari, koboltti ja molybdeeni. Monet näistä ovat tärkeitä kofaktoreita entsyymitoiminnassa. George ja muut lisäävät edellisiin raudan ja toteavat mikroravinteiden olevan kasvisolujen proteiinien komponentteja. Heidän mukaansa niillä on sekä metabolinen että fysiologinen vaikutus. He myös mainitsevat, että vähintään viittä näistä elementeistä tarvitaan klorofyllisynteesissä ja kloroplastien eli viherhiukkasten toiminnassa. Lisäksi mikroravinteita tarvitaan geneettisen laitteiston toimintaan ja monet niistä osallistuvatkin kasvuaineiden toimintaan. (George ym. 2008, 92.)

Rauta

Collin ja Edwards (1998,20) erottavat raudan mikroravinteista ja luokittelevat sen omaksi ryhmäkseen. Rauta on tärkeä entsyymikofaktori ja jotta sitä olisi saatavissa myös kasvatusalustan korkeassa pH:ssa, se lisätään alustaan ke-laattimuodossa. Georgen ja muiden mukaan kasvit käyttävät rautaa pääasiassa viherhiukkasissa, mitokondrioissa ja peroksisomeissa vaikuttaen näin hapetus-pelkistys-reaktioihin. Rautaa tarvitaan myös klorofyllin esiasteeseen ja fotosynteesissä elektroneja kuljettaviin proteiineihin. On havaittu, että rauta on

kelaattimuodossa EDTA:n kanssa vähemmän myrkyllinen kuin muussa muodossa ja sitä voidaan käyttää suuremmalla pH-välillä. (George ym. 2008, 98.)

Mangaani

Mangaanin todennäköisin tehtävä kasvissa on sen soluhengityksessä ja fotosynteesissä tarvittavien metalloproteiinien rakentumisessa. Tämän lisäksi George ja muut kertovat sitä tarvittavan useiden entsyymien toimintaan, viherhiukkasten ultra-rakenteen ylläpitoon sekä hapetus-pelkistysreaktioihin. Heidän mukaansa mangaani saattaa pystyä korvaamaan magnesiumin joissain entsyymisysteemeissä, liian suuri mangaanikonsentraatio on kuitenkin myrkyllinen. (George ym. 2008, 92.)

Sinkki

Sinkki on stabiilien metalloentsyymien komponentti ja sillä on monia eri tehtäviä. George ja muut (2008) tietävät sinkkiä tarvittavan yli 300 entsyymissä, muun muassa RNA-polymeraasissa. Kasvit, jotka eivät saa tarpeeksi sinkkiä, kärsivät jatkuvasta proteiini-, nukleiinihappo- ja klorofyllisynteesien heikentymisestä. Sekä sinkki- että molybdeenipuutteilla kasveilla klorofyllipitoisuus on pienentynyt ja kloroplastit ovat huonosti kehittyneet. Skoog havaitsi vuonna 1940 läheisen suhteen kasvin sinkin saannin ja auksiinipitoisuuden välillä. On myös esitetty, että sinkki olisi IAA-hormonin edeltäjän, tryptofaanin synteesissä toimivan entsyymin osa. (Mts. 92-93.)

Boori

Boori yhtenäistää solukalvoa ja vaikuttaa sen toimintaan kalvoproteiinien ja soluseinän eheyden kautta. Sitä tarvitaan fenolisten happojen metaboliaan sekä ligniinin biosynteesiin, jossa se on komponenttina tai entsyymin kofaktori. Lisäksi booria tarvitaan meristeemisen aktiivisuuden ylläpitämiseen, todennäköisesti siksi, että se osallistuu tyrellisten emästen synteesiin. Useissa tutkimuksissa on myös havaittu, että boori luultavasti stabiloi soluseinän ja -kalvon rakenteessa ja toiminnassa tarvittavia luonnollisia metallikelaatteja. Mikäli boori puuttuu, ligniinisynteesi ei tapahdu lainkaan. Todennäköisesti boori edistää luonnollisen auksiinin tuhoutumista kasvissa ja se johtaa myös sytokiniinisynteesin heikentymiseen. Boorin puute rajoittaa kasvien juuristoa,

toisaalta kuitenkin liika boori rajoittaa muodostuvien juurten lukumäärää. (George ym. 2008, 93-94.)

Kupari

Kupari on välttämätön ravinne vaikka sitä on kasveissa normaalisti ainoastaan muutamia miljoonasosia. Kuparia sisältävät entsyymit liittävät hydroksyyli ryhmiä monofenoleihin, jonka johdosta syntyy kasville tärkeitä polymeerisiä rakenneosia, kuten ligniiniä. Etyleenille tyypilliset kasvua rajoittavat vaikutukset johtuvat luultavasti kuparia sisältävän entsyymin vaikutuksesta etyleenin metaboliaan. (George ym. 2008, 95.)

Nikkeli, kloori, alumiini, natrium, jodi ja pii

George ja muut lisäävät mikroravinteisiin vielä nikkelin ja kloorin sekä toteavat joidenkin kasvilajien hyödyntävän tai jopa vaativan koboltin lisäksi alumiinia, natriumia ja jodia. Natriumionit eivät ole välttämättömiä kasvin kasvulle ja kehitykselle vaikka kasvi niitä absorboikin itseensä. Monet kasvit erittävät natriumia aktiivisesti juuriensa kautta säilyttääkseen sisäisen natriumkonsentraationsa matalana. (George ym. 2008, 87.)

Nikkeli on välttämätön ravinne kasville ja se on ureaa ammoniakiksi muuttavan ureaasientsyymin rakenneosa. Vuonna 1942 Taubck huomasi alumiinin olevan välttämätön joillekin saniaisille mutta niidenkään lisäyksessä alustaan ei yleensä lisätä alumiinia. Rainsin (1976) mukaan jodi saattaa olla hyväksi joidenkin levien kasvulle ja se kerääntyy korkeampiin kasveihin pieninä määrinä. Epstein (1971) havaitsi piin olevan hyödyllinen kasvien kasvulle ja lieventävän bioottista ja abioottista stressiä. Joidenkin kasvien kasvua piin lisääminen saattaa parantaa, todennäköisesti sitä on vähäisessä määrin kasvualustassa lisäämättäkin. (George ym. 2008, 96-97.)

Kloori on mukana vain muutamissa biologisissa reaktioissa, joten sitä tarvitaan erittäin pieniä määriä. Eräiden havaintojen mukaan kloori olisi välttämätön kasvin kasvun kannalta. Se voi myös toimia osmoottisessa säätelyssä, koska sen päätehtävä on nestejännityksen ylläpito. Lisäksi kloori tasapainottaa nopeita muutoksia vapaiden kationien määrissä. Useat kasvit sietävät suu-

riakin klooripitoisuuksia, kun taas jotkut lajit, kuten ruusut ovat hyvin herkkiä kloridi-ioneille. McCown ja Sellner (1987) raportoivat liian suuren kloorikonsentraation aiheuttaneen puuvartisten lajien lehtien kellastumista ja varren heikkoutta, joskus kudokset romahtivat ja jopa kuolivat. Kloorin ylimäärän onkin havaittu olevan yksi syy vesittymisen käynnistymiseen. (George ym. 2008, 90, 98.)

Koboltti ja molybdeeni

George ja muut pitävät hyvin pieninä määrinä molybdeeniä ja kobolttia kaikkien tärkeimpinä aineina terveen kasvin kasvulle. Niitä ei välttämättä tarvitsisi lisätä alustaan, koska jopa analyysilaadun kemikaalien on todettu sisältävän epäpuhtauksia, jotka tuovat alustaan mikroravinteiden lähteen. Myös hyytelöintiaineissa on epäorgaanisia aineita mutta on epäselvää, pystyykö viljelmä hyödyntämään niitä. Kobolttia ei kuitenkaan pidetä välttämättömänä aineena vaikka se Friesin (1962) mukaan onkin nukleiinihapposynteesissä tarvittavan B12-vitamiinin metallina. Koboltin kasvikudoksen kasvua ja morfogeneesiä stimuloivaa vaikutusta ei tosin ole erityisemmin havaittu. Albert (1958) toteaa koboltin lisäämisen hyödyn kumpuavan ajatuksesta, että se saattaa suojata kasvia metallikelaattien toksisuudelta ja se voi myös inhiboida eli estää kupari- ja rautaionien aiheuttamia hapetusreaktioita. Lisäksi Co^{2+} -ionit voivat estää etyleenin synteesin. (George ym. 2008, 90-95.)

Kasvi absorboi molybdeenin molybdaatti-ionina MoO_4^{2-} ja käyttää sen koodenarvoisena molybdeeninä. Molybdeeni on välttämätön typen käytön kannalta, koska se on tyyppiä sisältävissä entsyymeissä kofaktorina sekä osana monissa muissa kasvin entsyymeissä. (George ym. 2008, 95.)

Georgen ja muiden mielestä kaikista edellä mainituista välttämättömmimpiä ravinteita ovat seuraavat 17 ainetta: typpi, kalium, kalsium, fosfori, magnesium, rikki, rauta, nikkeli, kloori, mangaani, sinkki, boori, kupari, molybdeeni, hiili, happi ja vety. Näiden epäorgaanisten aineiden lisäksi kasvatusalustoissa käytetään myös erilaisia orgaanisia ravinteita, pääasiassa vitamiineja, aminohappoja ja tiettyjä muita lisäaineita. Näiden ravinteiden tarve riippuu kasvin lajista

ja genotyyppistä mikä juontuu mahdollisesti kasvin kyvystä valmistaa aineita synteettisesti. (George ym. 2008, 65, 115.)

9.3 Vitamiinit

Vitamiineista kasvatusalustoissa käytetään yleensä tiamiini- ja pyridoksiinihydrokloridia, nikotiinihappoa, pantotenaattia, parabentsoehappoa, myo-inositolia, biotiinia ja kolaatti- sekä koliinikloridia (Collin & Edwards 1998, 20). B-vitamiineihin näistä lukeutuvat tiamiinihydrokloridi (B1), pyridoksiinihydrokloridi (B6) ja nikotiinihappo (B3). Vitamiinipitoisuudet alustoissa ovat yleensä mmol/l eli mM (mts. 21).

George ja muut luokittelevat vitamiinien olevan välttämättömiä väliaineita tai aineenvaihdunnan katalyyttejä. Ehjät, koskemattomat kasvit pystyvät tuottamaan vitamiineja oman tarpeensa mukaan mutta silti niille voi tulla puutostiloja, jolloin kasvin selviytyminen ja kasvu parantuvat vitamiinilisäyksellä alustaan. Ennen vanhaan vitamiinien lähteenä ja korvikkeena käytettiin muun muassa hedelmämehuja, kookosmaitoa, hiiva- tai mallasuutteita sekä hydrolysoitua kaseiinia. Kyseiset aineet saattoivat tarjota alustalle vitamiineja, aminohappoja ja kasvunsääteitä, joten nykyään ne on miltei syrjäytetty tietyillä puhdalla orgaanisilla yhdisteillä. (George ym. 2008, 115.)

Inositoli

Kasvisolujen vitamiinitarve vaihtelee kasvin ja viljelmän tyyppin mukaan. Myo-inositoli (meso-inositoli, i-inositoli) on kasvien luonnollinen rakennusaine ja sen vaikutus kasviviljelmään perustuu luultavasti osittain siihen, että se osallistuu soluseinissä tarvittavien pektiinin ja hemiselluloosan synteesiin sekä sen rooliin ionien otossa ja käytössä. Pienien myo-inositolilisäyksien on havaittu kiihdyttävän solujen jakautumista ja joillakin kasveilla sen on havaittu olevan välttämätön ravinne. Myo-inositoli on osa B-vitamiinikompleksia ja sitä löytyy kookosmaidosta, hiivauutteesta sekä pieninä määrinä kaupallisesta agarista. (George ym. 2008, 116, 118.)

Tiamiini ja pantoteenihappo

George ja muut toteavat, että tiamiini on välttämätön kofaktori tiamiinipyrofosfaattimuodossaan hiilihydraattien metaboliassa. Näin ollen tiamiini osallistuu joidenkin aminohappojen biosynteesiin, ja useimpien kasvien kudokset tuntuvat vaativan sitä kasvaakseen. Tiamiini onkin vitamiineista käytetyin. Pantoteenihappo myös osallistuu tiettyjen kudosten kasvuun. Joillakin kasveilla se parantaa kalluksen tuotantoa, joillakin stimuloi kudoksen lisääntymistä ja joihinkin se ei vaikuta mitenkään. (George ym. 2008, 118.)

C-, D- ja E-vitamiinit, foolihappo ja riboflaviini

C-vitamiini eli L-askorbiinihappo osallistuu solun jakautumiseen ja pidentymiseen sekä toimii antioksidanttina. Lisäksi sitä käytetään eksplantaattien eli viljellyn kudoksen eristyksessä sekä estämään kudoksen mustumista. D-vitamiiniryhmästä etenkin D₂- ja D₃- vitamiineilla on kasvikudoksen kasvua säätelevä vaikutus, E-vitamiini eli α -tokoferoli toimii taas antioksidanttina. Muista vitamiineista foolihapon on todettu hidastavan kudoksen lisääntymistä pimeässä vaikka se parantaakin sitä valossa. Riboflaviinilla on havaittu kalluksen muodostumista inhiboiva vaikutus mutta Drew'n ja Smithin (1986) mielestä se voi parantaa versoja laadullisesti. Hiivauutetta lisättiin kasvualustoihin aminohappojen ja vitamiinien, etenkin inositolin ja tiamiinin lähteeksi. Nykyään se korvataan esimerkiksi glysiinillä, lysiinillä, arginiinilla, tiamiinilla ja nikotiinihapolla. (George ym. 2008, 118-119.)

9.4 Sokeri

Kasvualustan perusaineisiin kuuluu myös sokeri. Usein käytettyjä sokereita ovat sakkaroosi, fruktoosi, laktoosi, maltoosi ja tärkkelys. Näistä sokereista Collinin ja Edwardsin (1998, 21) mukaan tehokkain on sakkaroosi. Kuten George ja muut huomauttavat, sokeri toimii hiilen lähteenä, koska kasvi ei *in vitro* -olosuhteissa saa tarvitsemaansa hiiltä ilmakehästä, josta se sen normaalisti ottaa. Lisäksi kasvi saa sokerista energiaa ja se toimii myös osmoosin säätelyssä. Sakkaroosi kasvualustassa inhiboi klorofyllin muodostumista ja fotosynteesiä ja vähentää näin ollen autotrofisen eli omavaraisen kasvun mahdollisuutta. Yleensä sakkaroosi hydrolysoituu kokonaan tai ainakin osittain

glukoosiksi ja fruktoosiksi. Sakkarroosin jälkeen kasville paras hiilen lähde on glukoosi, joka tukee kasvua miltei yhtä hyvin kuin sakkarroosi; maltoosi ja raffiinoosi. Fruktoosi ei ole yhtä tehokas kuin edellä mainitut, mannoosi ja laktoosi ovat kaikkein sopimattomimmat ja galaktoosin on jopa sanottu olevan myrkyllistä kasvikudoksille. Kuitenkin galaktoosin on havaittu jossain tapauksissa vähentäneen tai pysäyttäneen versoviljelmien vesittymisen, myös fruktoosi on todettu tehokkaaksi vesittymisen estäjäksi. (George ym. 2008, 65, 124-126.)

Kasvien kyky käyttää harvinaisempia sokereita vaihtelee niiden lajin mukaan. Maltoosi esimerkiksi toimii sekä hiilen lähteenä että osmoosissa. Sakkarroosin käyttöön verrattuna maltoosin tapauksessa solun ulkopuolinen hydrolyysi on hitaampaa eli sokeria otetaan soluun ja hajotetaan sen sisällä hitaammin. Useilla lajeilla embryogeneesissä eli kasvullisessa alkionmuodostumisessa maltoosin on havaittu olevan yhtä hyvä ellei parempi kuin sakkarroosi. Sokereiden lisäksi *in vitro* -kasvatusalustoissa voidaan käyttää joitakin maissisii- rappeja, jotka saattavat yllyttää morfogeneesiä mihin sakkarroosi yksinään ei pysty. (George ym. 2008, 126-127.)

9.5 Muut lisäaineet

Perusaineiden lisäksi alustaan voidaan lisätä orgaanisen typen lähde, jona käytetään kaseiinihydrolysaattia (0,02–0,1 %), vitamiinitonta kaseiinihappoa tai yksittäisiä aminohappoja, kuten glysiiniä. Yksittäisillä aminohapoilla stimuloidaan kalluksen muodostumista, mutta ne inhiboivat kasvua, joten niitä käytettäessä on oltava erityisen varovainen. Yleisesti orgaanisen typen lähteenä käytettyjä aminohappoja ovat glysiini (2 mg/l), l-glutamiini, asparagiini, tyrosiini (100 mg/l), l-arginiini ja kysteiini (10 mg/l). (Collin & Edwards 1998, 21.) Su- luissa ilmoitetut luvut tarkoittavat aineen käyttöpitoisuutta.

Kasvualustaan voidaan lisätä myös aktiivihiiltä. Pierikin mukaan kasviperäinen hiili olisi parempaa kuin eläinperäinen, koska se sisältää suuremman prosenttiosuuden aktiivihiiltä. Aktiivihiili adsorboi alustasta kasvin erittämiä ruskeita ja mustia pigmenttejä eli fenolien tapaisia yhdisteitä sekä melaniinia ja muita tun-

temattomia, värittömiä myrkyllisiä yhdisteitä. Aktiivihielestä on havaittu olevan hyötyä puuvartisten kasvien kasvulle ja organogeneesille, lisäksi se stabiloi pH:ta ja mahdollisesti myös luovuttaa alustaan kasvua edistäviä aineita. Kasvien tuottamien polyfenolihdisteiden ja tanniinien poistaminen olisi tärkeää, koska ne yleensä tekevät kasvun ja kehittymisen mahdottomaksi. (Pierik 1987, 79-81.)

Kun soluviljelmiä ylläpidetään kiinteällä alustalla, se kiinteytetään agarilla, jota lisätään alustaan yleensä 6-10 g/l (Collin & Edwards 1998, 23). Haapalan ja Niskasen mukaan muiden orgaanisten aineiden lisäksi alustaan voidaan myös lisätä aktiivihieletä. Heidän mukaansa se estää alustassa joko agarista tai kasvista itsestään erittyvien myrkyllisten aineiden vaikutusta estäen solukon ruskettumista ja edistää versojen juurtumista. Toisaalta se kuitenkin alentaa kasvihormonien tehokkuutta. MTT:lla kasvualustoihin lisätään agarin mukana Bacto-Peptonea, jonka tarkoitus on edistää sienten ja bakteerien kasvua. (Haapala & Niskanen 1992, 43, 52.) Tällä keinolla kasvien sisäinen infektiota saattaa paljastua alustalla, eikä sitä tule silloin siirrettyä eteenpäin muihin versoihin.

9.6. Alustan ulkopuoliset kasviin vaikuttavat tekijät

Kasvualustan ravinnekoostumuksen ja pH:n lisäksi versojen kasvuun ja kehitykseen vaikuttavat monet muutkin tekijät kuten versoa ympäröivät kaasut (happi, etyleeni, hiilidioksidi), astian koko, kasvatushuoneen lämpötila, huoneen ja astian kosteus sekä valaistus. Kun tarkastellaan versoa kasvatusastiansa, on käsillä kolme eri pH:ta: version sisäinen, alustan pH sekä version ja alustan välinen pH. Alustan pH:n tulisi olla sellainen, että se ei häiritse kasvukudosta millään lailla. Hyväksyttävissä rajoissa pysyessään pH lisäksi säätelee suolojen pysymistä liukenevassa muodossa, vaikuttaa etenkin entsyymien katalysoimiin kemiallisiin reaktioihin sekä agarin hyytelöimistehokkuuteen ja alustan ravinteiden ja hormonien ottoon. Alustan pH-arvo muuttuu viljelyn aikana mutta alkuperäinen pH tulisi säätää välille 5,5-6,0. Väärän pH:n haitta-

vaikutus ilmenee yleensä ionien saatavuudessa ja ravinteiden ottamisessa, ei niinkään solujen vaurioitumisena. (George ym. 2008, 143, 428-455.)

10 KASVUNSÄÄTEET ELI KASVIHORMONIT

Tärkeä kasvualustan perusainesosa sekä yksi tämän tutkimuksen kohteista on kasvunsääteet. Collinin ja Edwardsin (1998) mukaan kasvunsääteiden määrä kasvin alustassa on kriittisin tekijä kalluksen tai solususpension kasvussa ja erilaistumisessa. Kasvunsääteet paitsi stimuloivat solun jakautumista myös kontrolloivat solujen erilaistumista ja morfogeneesiä. Kasvunsääteinä käytettyjen auksiinien ja sytokiniinien optimaaliset konsentraatiot vaihtelevat kasvilajeittain. Kasvunsääteisiin kuuluvat myös gibberelliinit ja abskissihappo mutta ne eivät ole kovinkaan yleisessä käytössä. (Mts. 21.)

Kasvi tuottaa itse kasvihormoneja, jotka pieninä määrinä edistävät kasvin kasvua ja kehitystä. Liian suuri määrä kasvihormonia puolestaan on kasville myrkyllistä. Synteettistä auksiinia 2,4-D:a käytetään näin ollen muuan muassa rikkaruohojen torjuntaan. (Haapala & Niskanen 1992, 42.)

10.1 Auksiinit

Auksiinit ovat varsinkin juurrutuslustoissa käytettäviä kasvihormoneja, jotka edistävät version ja juuren kasvua laajentamalla soluja (Haapala & Niskanen 1992, 42). Pierikin (1987, 69) mukaan auksiinit myös kiihdyttävät solun jakautumista ja kalluksen muodostumista mutta inhiboivat jälkiversojen ja hankaversojen muodostumista sekä alkionmuodostusta solususpensioissa. *In vitro*-lisäyksessä useimmin käytetty luonnonauksiini on IAA. Yleisimmät synteettiset auksiinit ovat NAA, IBA, aiemmin mainittu 2,4-D sekä ja parakloorifenoksietikahappo pCPA. (Haapala & Niskanen 1992, 42.) Pierik (1987, 69) lisää tähän, että 2,4-D:n käytön tulisi olla mahdollisimman rajoitettua sen mutageenisyy-

den vuoksi. Lisäksi 2,4-D inhiboi fotosynteesiä kasvilla, mihin muut auksiinit eivät pysty.

10.2 Sytokiniinit

2-isopentenyyliadenopuriini eli 2iP sekä zeatiini ovat mikrolisäyksessä käytettäviä luonnollisia sytokiniineja. Synteettisiä puolestaan ovat kinetiini ja BAP. Yleisesti sytokiniinit edistävät solunjakautumista ja konsentraatioilla 1-10 mg/l ne estävät juuren muodostumisen ja parantavat verson kasvua (Haapala & Niskanen 1992, 42). Sytokiniinien on havaittu olevan tarpeellisia solujen jakautumisessa solukkoviljelyssä. Ne saattavat olla oleellisia mitoosin aikaisen kromosomirungon syntyyn ja toimintaan liittyvien proteiinien synteessissä. Sytokiniinien vaikutus voi tosin vaihdella käytettävän yhdisteen, viljelmämuodon ja kasvilajikkeen mukaan, josta se on saatu sekä sen mukaan, onko verso otettu nuoresta vai aikuisesta kasvista. Leveälehtisten kasvien lisäyksessä alustaan lisätään useasti yhtä tai useampaa sytokiniinia, jotta saadaan tuettua hankasilmujen kasvua ja vähennettyä latvan hallitsevuutta. Liian korkea sytokiniinipitoisuus kasvattaa paljon pieniä versoja, jotka eivät tule kasvamaan pituutta. Se voi aiheuttaa joillakin lajeilla myös epänormaaleja lehtien muotoja sekä yllyttää versojen vesittymistä. Joissain viljelmissä sytokiniinit saattavat tuottaa ruusukemaisia versoja tai versoja, jotka kasvavat todella hitaasti muodostumisensa jälkeen. Lisäksi kinetiinin on havaittu olevan kykenemätön edistämään ruusuverson kärjen kasvua. (George ym. 2008, 440-441.)

Georgen ja muiden (2008, 441) mukaan sytokiniineilla on juurten kasvua inhiboiva tai viivästyttävä vaikutus mikä ilmenee etenkin korkeilla (0,5-10 mg/l) konsentraatioilla. Lisäksi ne estävät juurten kasvua kokonaan ja kumoavat auksiinien edistävän vaikutuksen juurten initiaatioon. Mikrolisäyksen *in vitro* -juuritusvaiheessa sytokiniinit jätetään yleensä alustasta pois, jotta ne eivät estäisi juurten muodostumista. Joissain tapauksissa saattaa olla tarpeen viljellä versoja yhdellä tai useammalla sytokiniinittomalla alustalla, jotta kudoksen sisäinen sytokiniinikonsentraatio laskee riittävän alas.

10.3 Gibberelliinit

Kolmas kasvihormoniryhmä ovat gibberelliinit. Ne aktivoivat solunjakautumista ja edistävät verson pituuskasvua. Mikrolisäyksessä käytetään GA_3 -gibberelliinihappoa muiden kasvunsäätteiden kanssa. Aikuisilla kasveilla gibberelliini vaikuttaa esimerkiksi kukinnan alkamiseen ja talvihorroksen päättymiseen. (Haapala & Niskanen 1992, 42.) Georgen ja muiden mukaan gibberelliini kiihdytti ruusulla latvan kasvua ja muodosti poikkeavat, ohentuneet lehdet, yhtään uutta lehteä tai juuria ei muodostunut. Yleisesti ottaen gibberelliinit inhiboivat juurten muodostusta, etenkin auksiinin läsnä ollessa. Tämän vuoksi gibberelliinia sisältävällä alustalla kasvatetut versot saattavat tarvita ennen juurrutusta alustan, jossa on auksiinia mutta ei lainkaan gibberelliinia. On myös havaittu, että gibberelliinin lisääminen (genotyypistä riippuen 0,1-1,0 mg/l) BAP:a 1-5 mg/l sisältävään alustaan on välttämätöntä joidenkin Rosa hybrida -lajikkeiden versojen moninkertaistumiseksi. Goldy -lajike ei kyseisen kokeen mukaan lisääntynyt ennen kuin alustaan oli lisätty 1,0 mg/l gibberelliinia. Edellisten havaintojen lisäksi Valles ja Boxus (1987) havaitsivat kokeessaan GA_3 :n (0,1 mg/l) lisäämisen alustaan estävän Rosa hybrida -versojen kuolemista (George ym. 2008, 450).

Gibberelliinikäsittelyä on satunnaisesti käytetty pidentämään versoja mikrolisäyksen aikana tai ennen juurrutusta. Käsittely voi olla hyödyllinen silloin kun suuri sytokiniinikonsentraatio on aiheuttanut paljon lyhyitä versoja. Gibberelliinin käytöllä on myös haittavaikutuksensa: suurimmalle osalle kasveista gibberelliinin käyttö mikrolisäyksessä on haitallista. Kasvit tuottavat pitkiä mutta kaapelehtisiä versoja, lisäksi gibberelliinilla käsiteltyjä versoja voi olla hankala juurruttaa. (George ym. 2008, 450-451.) Pierikin (1987, 73) mukaan gibberelliineilla on lisäksi jälkiversojen kasvua estävä vaikutus.

11 ALUSTAKOKEEN SUORITUS

11.1 Alustat

Kirjallisuuden perusteella kokeeseen valittiin Quoirin-Lepoivren Prunus-alusta sekä MTT:lla tavallisesti käytössä ollut G-alusta. Näiden alustojen koostumukset käyvät ilmi taulukosta 1 sekä taulukosta 2. Quoirin-Lepoivre-alustan mikro-ravinteista mangaani-, sinkki- ja kuparisulfaatti liuotettiin erillään pieneen määrään tislattua vettä, liuokset yhdistettiin litran mittapullossa ja näin saatua liuosta käytettiin perusliuksena. Myös boorihappo ja kaliumjodidi liuotettiin erillään ja yhdistettiin litraksi, samoin kaikki vitamiinit. G-suola-alustan ravinteista valmistettiin perusliuokset siten, että NH_4NO_3 , KNO_3 , KH_2PO_4 ja $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ liuotettiin erillään pieneen määrään vettä ja kyseiset liuokset yhdistettiin mainitussa järjestyksessä. Samoin yhdistettiin H_3BO_3 , $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ja KI. Kupari-, sinkki- ja mangaanisulfaatti yhdistettiin sulfaattiliuokseksi ja vitamiinit vitamiiniliuokseksi. 500 ml:aan BAP-perusliuosta punnittiin 0,05 g BAP:a ja 100 ml:aan gibberelliiniliuosta punnittiin 0,01 g GA_3 -gibberelliinihappoa. BAP liuotettiin 1 N natriumhydroksidiin ja GA_3 kuumentamatta 50 % etanoliin.

Molempia alustoja valmistettiin kaksi litraa jokaista hormonyhdistelmää kohti. Kolmen litran dekantterilasissa liuotettiin 60 grammaa sakkaroosia tislattuun veteen ja lisättiin 100 mg myo-inositolia sekä ravinneliuoksia perusliuksistaan tarvittut määrät. Alustan ainekset sekoitettiin huolellisesti magneettisekoittajalla ja liuoksen pH säädettiin 5,0:ksi. Kahden litran autoklaavipulloon punnittiin 16 grammaa agaria ja 0,54 grammaa Bacto-Peptonea. Liuos kaadettiin pulloon ja sekoitettiin hyvin ennen autoklavointia. Alustat keitettiin autoklaavissa kahden litran pulloissa 15 minuutin ajan. Keiton jälkeen alusta annosteltiin kuumana annostelulaitteella 100 ml:n erlenmeyerkolveihin, joihin jokaiseen laitettiin noin 31 ml. Korkiksi kolveihin laitettiin kaksinkertainen foliokansi, kooltaan noin 8 cm x 8 cm. Erlenmeyerit steriloidtiin autoklaavissa 21 minuutin ajan. Alustojen annettiin olla huoneenlämmössä mahdollisuuksien mukaan vähintään kaksi tai kolme päivää, jotta havaittiin alustoissa mahdollisesti ilmenevä kontaminaatio. Huoneenlämmössä pitämisen jälkeen alustat menivät välittömästi käyttöön.

Yleensä MTT:lla keitetään alustoja jopa kuusitoista litraa, jolloin kaikkea ei heti käytetä ja ylimääräiset alustat varastoidaan kylmiöön. Ne pyritään kuitenkin käyttämään huoneenlämpöisinä.

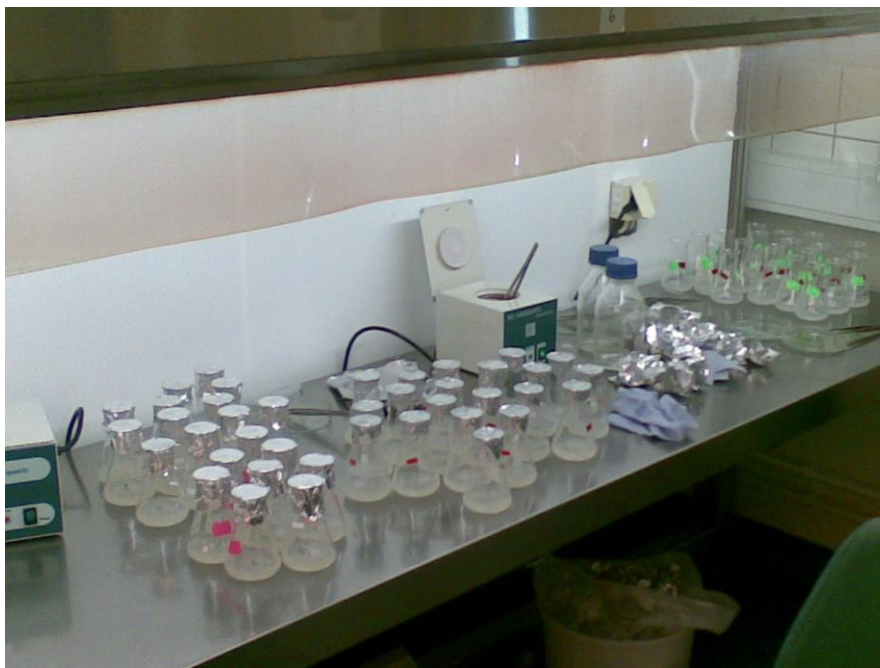
Juurutusvaiheessa kaikille ruusuille ja alustoille keitettiin samaa juurrutusalustaa yhteensä kolme litraa. Juurrutusalusta sisälsi 30 g/l sakkaroosia, 0,05 g/l inositolia, 50 ml rautaliuosta sekä 20 ml IAA: a. Agarialustaan käytettiin 8 g/l ja Bacto-Peptonea 0,27 g/l. Alustan tarkempi koostumus löytyy liitteestä 3. Alustan mitattu pH oli 4,72. Samalla kun Williams' Double Yellow'lle ja Tove Janssonille keitettiin juurrutusalusta, Soinnulle keitettiin hormoniton välikasvatusalusta eli sekä G- että Quoirin-Lepoivre -alusta mutta ilman hormoneja. Sen tarkoituksena oli kasvattaa versoille pituutta, koska Sointu kasvoi suurina, lyhytversoisina tuppaina eikä versoja pystynyt selkeästi laskemaan. Suurin osa versoista oli kasvanut alustalla pituutta (ks. kuvio 7.) ja siten tupas oli selkeytynyt, jolloin siitä saatiin helpommin eroteltua yksittäiset versot. Kukin eri alustan versot laitettiin omaan rasiaansa juurtumaan. Näin ollen kaikista ruusuista ja alustoista tuli 24 rasiaa, joissa oli juurtumassa 2...114 versoa.



KUVIO 7. Soinnun verso hormonittoman välikasvatusalustan jälkeen.

11.2 Kasvit

Ruusujen lisäystä varten sekä laminaarikaappi että kaikki siihen laitettavat esineet pyyhittiin desinfiointiaineella. Pienissä lasipurkeissa kasvatetuista ruusutuppaista leikattiin steriilisti sopivia versoja, jotka laitettiin koealustoille erilenmeyereihin kasvamaan (ks. kuvio 8).

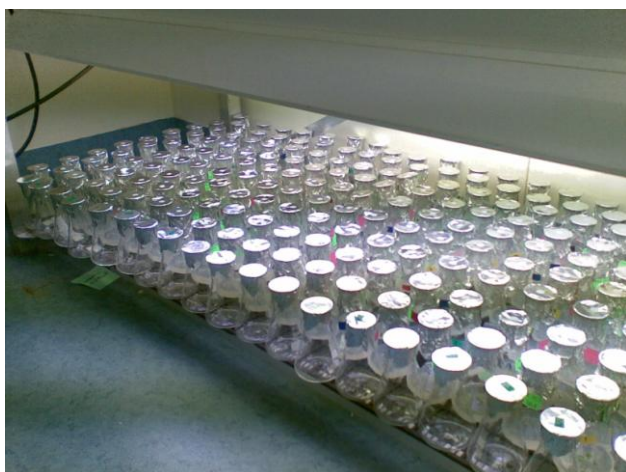


KUVIO 8. Ruusujen lisääminen laminaarikaapissa

Kokeessa käytettiin kolmea eri ruusulajiketta ja koealustoja testattiin yhteensä kahdeksaa erilaista. G-alustalla (perusalusta F11) viisi viikkoa kasvaneet versot jaettiin ja siirrettiin koealustoille kasvamaan. Jokaiselle ruusulajikkeelle oli kahdeksan erilaista koealustaa, joista neljässä alustassa oli Quoirin-Lepoivren ravintosuolat ja neljässä G-suolat. Sekä Quoirin-Lepoivren alustassa että G-alustassa oli kummassakin neljä eri hormonipitoisuutta. Alustoissa oli 6-bentsyliaminopuriinia BAP 1,0; 1,0; 2,5 ja 5,0 mg/l sekä vastaavasti gibberelliiniä GA_3 0; 1,0; 1,0 ja 1,0 mg/l. Jokaiselle koealustalle tarvittiin 20 versoa kustakin koerususta eli yhteensä 160 versoa kutakin ruusua, kaikkiaan 480 versoa. Korkkina käytettiin ilmastointireiällä varustettua steriiliä foliokorkkia.

Ruusualustoissa ei MTT:lla yleensä ole käytetty gibberelliiniä, joten testasimme sen vaikutusta yhdessä BAP:n kanssa. Alustat merkittiin selvyuden vuoksi kokeen ajaksi värikoodeilla: Quoirin-Lepoivren alustan koodit kasvavan hormonipitoisuuden mukaan olivat harmaa, keltainen, vihreä ja punainen, ja G-alustan koodit musta, valkoinen, sininen ja raidallinen (ks. taulukko 3). Koejärjestelyn alkuperäisissä paikkakartoissa (ks. liite 5, kuvat 1-3) raidallinen alusta oli merkitty ruskealla.

Myöhemmissä lisäyksissä jatkoon laitettiin jokaisesta koealustasta jälleen 20 versoja, mikäli ruusut olivat lisääntyneet niin paljon. Ylimääräiset versot laitettiin kasvamaan tavalliseen foliokantiseen purkkiin ruusuilla käytetylle F11-alustalle, joka sisälsi sokerina fruktoosia 30 g/l, BAP:a 0,75 mg/l sekä G-suolat eli samat kuin ruusukokeessa käytetyssä G-alustassa. F11-alustalle laitettuja versoja ei laskettu enää kokeeseen mukaan muuten kuin lisääntymiskertomina. Ylimääräisiä versoja ei voitu laittaa uusiin erlenmeyereihin, koska koejärjestelyn tuli olla kahdeksan kertaa kaksikymmentä erlenmeyeria ja jos ylimääräisiä erlenmeyereita olisi otettu mukaan, ne olisivat menneet eri hyllylle ja täten niiden koeolosuhteet olisivat olleet erilaiset. Koe-erlenmeyerit oli aseteltu kasvatushuoneen oikealla puolella oleville alimmille hyllyille, kuten kuvioista 9 ja 10 käy ilmi.



KUVIO 9. Koeasetelma kasvatushuoneessa, Williams' Double Yellow



KUVIO 10. Koeasetelma kasvatushuoneessa, Sointu ja Tove Jansson

Ruusut lisättiin kaikkiaan kolme kertaa neljän viikon välein. Sointu lisättiin neljä kertaa, koska sen versoja yritettiin pidentää ylimääräisellä hormonittomalla kasvualustalla. Lisäysjakojen jälkeen Soinnun ja Tove Janssonin versoja oli jäljellä vaihtelevasti (ks. taulukot 5 ja 6). Huonoimmillaan Soinnun versoja selviytyi juurrutus-alustalle laitettavaksi vain kuusi, parhaalta alustalta tuli kuitenkin 114. Tove Janssonin lisääntyminen oli huomattavasti kehnompaa: juurrutukseen selvisi vain neljästä kahteentoista versoa alustaltaan. Suurin osa versoista oli kuollut, muutama kontaminoitunut ja jotkut elossa säilyneet olivat muuten vain niin huonoja, ettei niitä kannattanut juurruttaa. Ylipäänsä kaikki versot olivat juurrutukseen liian pieniä, jopa Soinnun versot vaikka niitä yritettiin kasvattaa välialustalla pidemmiksi.

Koealustojen erlenmeyerit numeroitiin yhdestä kahteenkymmeneen aina jokaisen eri alustan sisällä ja kolvien paikat hyllyllä arvottiin. Arvontatuloksista piirrettiin kartat (ks. liite 5, kuvat 1–3), joiden mukaan erlenmeyerit sijoitettiin hyllylle. Karttoja tuli siis kolme, jokaiselle ruusulle omansa. Jokaisen lisäyksen yhteydessä versoille arvottiin uudet paikat. Arpomalla versojen kasvatuspaikat saatiin eliminoidua mahdollinen kasvupaikan vaikutus verson kehittymiseen. Reunimmaisiksi hyllyille laitettiin tyhjät korkitetut erlenmeyerit, jotta reunimmaisiiin versoihin ei tulisi reunavaikutusta eli valo ja lämpötila olisivat niille samanlaiset kuin niille, jotka kasvavat keskimmaisina. Versojen sijoittumista ei

seurattu lisäyksen aikana: ei siis esimerkiksi listattu mikä verso kasvoi Tove Janssonilla mustan alustan erlenmeyerissa numero kolme ja mihin se siitä siirtyi. Havainnoista ei näin ollen pysty tarkalleen sanomaan onko mahdollisesti kuollut verso ollut edellisellä lisäyskerralla vielä hyvä ja elinvoimainen vaiko jo hiukan kärsinyt ja huono. Todennäköisesti kuitenkin huono verso on kuollut ja hyvä säilynyt hengissä. Lisäysvaiheessa havaittiin osalla versoista vesittymistä. Versot olivat kuin turvonneita ja lasimaisia eikä niitä voinut viljellä enää eteenpäin.

Kahden päivän ajan kasvatushuoneessa vallitsi poikkeusolosuhteet, valo ja lämpötila vaihtelivat rajusti epäkuntoisen ilmastoinnin vuoksi. Versoihin tämä olosuhdevaihtelu tuskin vaikutti, koska ne olivat ehtineet kasvaa normaaliolosuhteissa jo kokeessa käytetyn kasvatusaajan (neljä viikkoa) miltei kokonaan ja ne lisättiin kolmannen ja viimeisen kerran jo muutaman päivän kuluttua lämpötila- ja valovaihtelusta.

Lisäysjakojen jälkeen oli tarkoitus tehdä juurrutus-alustakokeita juurruttamalla versoja erilaisilla juurrutus-alustoilla. *In vitro* -juurrutuksen jälkeen versot olisi kouluttu turpeelle ja havainnoitu eri alustoilta tulleiden versojen juurten muodostusta. Juurrutukseen selvisi kuitenkin niin vähän versoja, ettei juurrutuskokeita pystytty tekemään. Juurrutusvaiheessa elossa olleet versot (ks. liite 2, taulukot 1-4) laitettiin samanlaiselle juurrutus-alustalle muovirasioihin, eri lisäys-alustoilta tulleet versot eri rasioihin. Juurrutus-alustan koostumus käy ilmi liitteen 6 taulukosta 9. Kasvatushuoneessa rasioiden päälle laitettiin kaksinkertainen harso estämään liiallista valon saantia sekä IAA-hormonin mahdollista valosta johtuvaa hajoamista. Kuten jo aiemmin todettiin, versoja tarkasteltiin 20 päivän kuluttua: suurin osa oli kuolleita (ks. liite 2, taulukot 1-4). Versojen kasvu näytti pysähtyneen paikoilleen eikä yhdessäkään versossa ollut juuria. Sekä version tyvi että sitä ympäröivä agar oli hyvin monella versolla mustunut. Jos juurrutus sujuisi niin kuin sen pitäisi, kolmen päivän kuluttua juurrutus-alustalle laitosta tulisi tapahtua induktio, neljästä seitsemään päivään tapahtuu initiaatio, jolloin juurten kasvu käynnistyy. Kymmenennen päivän tienoilla juuret olisivat jo näkyvissä. Juurtuneet versot koulittaisi perliittiturvealus-

talle ja kuukauden kuluttua niistä laskettaisiin kasvuunlähtöprosentti. Samalla tarkasteltaisiin kasvien juuria; niiden lukumäärää ja pituutta.

12 KOKEEN TULOKSET JA POHDINTA

Ruusulajikkeet eivät menestyneet järin hyvin Quoirin-Lepoivren alustoilla. Ne eivät selvästikään vaadi gibberelliiniä kasvaakseen. Molemmilla koesuola-alustoilla versot kasvoivat parhaiten alustalla, jossa ei ollut gibberelliiniä. Kun vähennetään jokaisen alustan tuottamista versoista lajikkeittain alkuperäinen määrä eli 20 versoa, nähdään näin saadusta taulukosta 7 alustojen paremmuusjärjestys tuottavuuden perusteella.

TAULUKKO 7. Alustojen paremmuusjärjestys tuottavuuden perusteella

| Alustat | Tuottavuus (kappaletta versoja) |
|---|--|
| Musta (G-suolat, BAP 1,0 mg/l; GA ₃ 0 mg/l) | 255 |
| Valkoinen (G-suolat, BAP 1,0 mg/l; GA ₃ 1,0 mg/l) | 165 |
| Sininen (G-suolat, BAP 2,5 mg/l; GA ₃ 1,0 mg/l) | 146 |
| Raidallinen (G-suolat, BAP 5,0 mg/l; GA ₃ 1,0 mg/l) | 146 |
| Harmaa (QL-suolat, BAP 1,0 mg/l; GA ₃ 0 mg/l) | 106 |
| Keltainen (QL-suolat, BAP 1,0 mg/l; GA ₃ 1,0 mg/l) | 91 |
| Punainen (QL-suolat, BAP 5,0 mg/l; GA ₃ 1,0 mg/l) | 71 |
| Vihreä (QL-suolat, BAP 2,5 mg/l; GA ₃ 1,0 mg/l) | 66 |

Sekä tämän tuottavuustaulukon (ks. taulukko 7) että kuvioiden 1–3 perusteella musta alusta (G-suolat, BAP 1,0 mg/l; GA₃ 0 mg/l) näyttäisi olleen kaikille ruusuille sopivin. Kuten kuviosta 2 nähdään, kyseinen lisäysalusta on sopinut mainiosti etenkin Soinnulle. Kuolleisuus on 0 % ja versot ovat lisääntyneet verrattain paljon (ks. taulukko 5). Sekä Soinnulle että muillekin ruusuille Quoirin-Lepoivre-suolakoostumus on selvästi sopimattomampi kuin G-suolat. Taulukoiden 4–6 perusteella voidaan myös päätellä, että gibberelliini ei sovellu näille ruusulajikkeille. Gibberelliinin puuttuminen näyttäisi olevan suolakoostumuksen jälkeen ratkaisevin tekijä. Suuri BAP-pitoisuus ei myöskään ollut edullista versojen kehitykselle.

Tulevaisuudessa alustoja voisi kehittää suoraan MTT:lla käytetystä F11-alustasta. Olisi ollut mielenkiintoista sisällyttää kokeeseen myös fruktoosialustoja sakkaroosin rinnalle. Jatkossa kannattaisi ehkä tutkia aivan pelkän soke-
rin vaikutusta ruusujen kasvuun ja lisäksi kokeilla eri hormoneja. Gibberelliinis-
tä Sointu, Tove Jansson ja Williams' Double Yellow -ruusulajikkeet eivät pitä-
neet, sen sijaan muitakin sytokiniineja kuin BAP:a voisi kokeilla. Hasegawa
(1980) tutki mikrolisättyjen ruusujen versojen ja juurten initiaatioon liittyviä teki-
jöitä. Kokeessaan hän käytti erään Rosa hybrida -lajikkeen versoja, joita oli
viljelty MS-alustalla hormoneina IAA (0,3 mg/l) sekä BAP kolmena eri pitoisuu-
tena (1,0; 3,0 ja 10,0 mg/l). Neljän viikon aikana versot lisääntyivät kuusinker-
taisesti ja 10...14 päivän aikana hormonittomalla perusalustalla versot muo-
dostivat juuret. Hasegawa (1980) sai siirrettyä versot menestyksekkäästi tur-
peelle mutta hän kuitenkin havaitsi NAA:n (0,03 tai 0,10 mg/l) tai IAA:n (1,0
mg/l) lisäyksen tai MS-suolojen konsentraation laskemisen puoleen tai jopa
neljäsosaan alkuperäisestä parantavan sekä juurten muodostusta että verso-
jen siirrettävyyttä. BAP:n ja 2iP:n hän havaitsi inhiboivan juurten muodostusta
ja siirrettävyyttä jopa erittäin pieninä pitoisuuksina. (Mts. 216-220.) Skirvin ja
Chu (1979, 608-610) puolestaan kasvattivat Rosa hybrida 'Forever Yours' -
ruusun versoja *in vitro* muunnetulla MS-alustalla, jossa oli lisänä 2,0 mg/l
BAP:a sekä 0,1 mg/l NAA:a. Versot juurrutettiin hormonittomalla MS-alustalla,
jonka suolapitoisuus oli pienennetty 1/4 alkuperäisestä.

Ruusujen mikrolisäys saattaisi onnistua paremmin jossain muussa astiassa
kuin erlenmeyerissa. Kolvi ei sovellu ruusulle kovinkaan hyvin sen muodon
vuoksi: ruusu kasvaa ylös päin leveneväksi tuppaaksi kun taas itse kolvi vas-
taavasti kaventuu. Hyvä muoto ruusun astialle olisi erlenmeyer ylös alaisin.
Erlenmeyerissa agar tuntuu myös kuivuvan liian nopeasti. Osasyynä saattoi
tietenkin olla ilmastointireiällinen korkki. Joka tapauksessa alustan liiallinen
kuivuminen on haitaksi, koska silloin kasvin ravinteiden saanti heikkenee.

Jo kasvun aikainen karaisu olisi mikrotaimille tärkeää, koska ne ovat kehitty-
neet kasvatusastian korkeassa ilmankosteudessa eikä niillä näin ollen ole va-
hapeitettä eikä haihtumiselta suojaavaa karvoitusta lehdistään. Kun juurrutet-
tu mikrotaimi siirretään kosteasta astiastaan turpeelle, se kokee valtavaa

stressiä ja se saattaa kuivua helposti. Stressin pienentämiseksi yritin karaista ruusujen versoja jo kasvatuksen aikana. Jokaisella kolmella lisäyskerralla (Soinnalla neljällä lisäyskerralla) erlenmeyereihin vaihdettiin lisäysjaon yhteydessä ilmastoitu foliokorkki. Sen käyttäminen joka kerralla lienee stressannut versoja liikaa, koska yleisesti ottaen versojen määrä väheni kerta kerralta alustasta riippumatta. Olisi saattanut ehkä olla parempi käyttää ilmastoitua korkkia vain viimeisellä lisäyskerralla ennen juurrutus-alustalle laittoa.

Toisaalta taas voidaan ajatella, että versot saattoivat karaistua jo liikaa ja tottua myös niin kutsuttuun ulkoilmaan, joten ne juurrutus-alustalle laitettaessa saattoivat tavallaan tukehtua. Juurrutus-alustathan olivat muovisissa pakasterasioissa, joiden kansi oli umpinainen eivätkä kaasut näin ollen päässeet vaihtumaan yhtä vapaasti kuin ilmastointikorkkillisissa erlenmeyereissa. Versojen kasvu tuntui täysin pysähtyneen juurrutus-alustalla, juuria ei muodostunut eikä kasvi muutenkaan voinut hyvin. Suurimmaksi osaksi versojen tyvessä agar oli mustunut, joten ne erittivät paljon fenolia. Juurrutuksen tuloksista ei voida kuitenkaan vetää johtopäätöksiä, koska lisäysalustat vaikuttavat aina myös juurrutukseen. Tällöin ei pystytä toteamaan, onko versojen kuoleminen juurrutus-alustalla ollut kiinni karaisusta tai umpinaisesta astiasta.

Ongelmallisille ruusuille, Soinnulle ja Tove Janssonille, ei löydetty kunnollista kasvualustaa tällä kokeella. Seuraavia ruusujen alustakokeita ajatellen saatiin kuitenkin viitteitä siitä, mitä ei kannata enää kokeilla. Quoirin-Lepoivren alustaa on turhaa sisällyttää myöhempiin alustakokeisiin, koska se ei selvästikään toimi ruusuilla. Gibberelliinia ei myöskään tarvitse enää testata, koska se ei edistänyt versojen lisääntymistä. Soinnun versonmuodostus meni jo liialliseksi, koska se muodosti tavattoman paljon pieniä, tiheässä kasvavia versoja, joita ei pystynyt laskemaan. Tästä voidaan päätellä, että alustassa oli liikaa hormonia Soinnun tarpeisiin. Sille optimaalinen BAP-pitoisuus saattaisi löytyä 0,5 mg/l tienoilta mutta kuitenkin reilusti 1,0 mg/l alapuolelta. Tove Janssonille ja Williams' Double Yellow'ille optimaalinen BAP-pitoisuus lienee 1,0 mg/l tienoilla.

Lisäysalustassa kannattaisi myös kokeilla eri sokeria. Fruktoosin on havaittu tehostavan BAP:n vaikutusta, joten niitä kannattaisi ehdottomasti kokeilla yhtä aikaa seuraavissa alustakokeissa. Mielenkiintoinen ja kokeilemisenarvoinen sokeri olisi myös glukoosi. Sitä lienee harvemmin käytetty ruusuilla, joten sitä kannattaisi testata fruktoosin rinnalla. Kaikkia kolmea sokeria voisi testata rinnakkain sekä käyttää useita eri hormonipitoisuuksia, esimerkiksi BAP:a 0,5...1,5 mg/l. Lisäysalustakokeiden jälkeen olisi ehkä hyvä tehdä juurrutus- alustakokeet erikseen perusalustalta tulevilla versoilla. Alustakokeista voitaisiin ehkä saada kaiken kaikkiaan parempia tuloksia, jos lisäys- ja juurrutus- kokeet tehtäisiin ensin erikseen ja sitten vasta kokeiltaisiin toimivia alustoja yhdessä.

LÄHTEET

- Alanko, P. 2003. Koristepuut ja -pensaat. Kotipihan suosituimmat puuvartistet kasvit. Helsinki: Tammi.
- Badzian, T., Hennen, G.R. & Fotyma-Kern, J. 1991. In vitro Rooting of Clonal Propagated Miniature Rose Cultivars. *Acta Horticulturae* 289, 329–330.
- Bean, W.J. 1980. Trees & Shrubs Hardy in the British Isles. Revised volume IV Ri-Z. 8th edition.
- Collin, H.A. & Edwards, S. 1998. Plant Cell Culture. Oxford: BIOS Scientific Publishers.
- Debergh, P.C. & Zimmerman, R.H. 1991. Micropropagation Technology and Application. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers.
- De Proft, M.P., Van den Broek, G. & De Greef, J.A. 1987. Involvement of Ethylene on Senescence and Vitrification of in vitro Cultured Miniroses. *Acta Horticulturae* 212, 217–222.
- George, E.F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The Technology. 2nd edition. England: Exegetics.
- George, E.F., Hall, M.A. & De Klerk, G-J. 1993/1996. Plant propagation by tissue culture. Volume 2. In practice. 2nd edition. England: Exegetics.
- George, E.F., Hall, M.A. & De Klerk, G-J. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1 The Background. 3rd edition. The Netherlands: Springer.
- Gustavsson, L-Å. 1998. Rosor för nordiska trädgårdar. Finland: Gummerus.
- Haapala, T. & Niskanen, A-M. 1992. Pohjoisten puuvartisten kasvien mikro-lisäys. Helsinki: VAPK-kustannus.
- Hasegawa, P. M. 1980. Factors Affecting Shoot and Root Initiation From Cultured Rose Shoot Tips. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 105, 2, 216–220.
- Hokka, H., Laamanen, J., Lahtonen, V., Pöyhönen, P. & Uosukainen, M. 2008. Varmennetun taimituotannon emokasvihinnasto vuonna 2009 Laukaa. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksen Laukaan toimipaikka.
- Kevers, C., Boyer, N., Courduroux, J-C & Gaspar, T. 1992. The Influence of Ethylene on Proliferation and Growth of Rose Shoot Cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28, 175–181.
- Laamanen, J. & Nukari, A. 2010. Meristeemi-, versonkärki- ja jälkisilmuviljelyn erot. Sähköpostiviesti. 6.4.2010. Vastaanottaja H. Pirttinen.

Mellbye, L. 1994-1995. Suomen ja Pohjolan ruusut. Porvoo: Werner Söderström.

Nilson, S. & Nilson, K.L. 1994. Ruusutarha, iloa ja hyötyä ruusunviljelystä. Helsinki: Otava.

Pierik, R. L. M. 1987. In vitro Culture of Higher Plants. Dordrecht. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers.

Podwyszynska, M. & Goszczynska, D. M. 1998. Effect of Inhibitors of Ethylene Biosynthesis and Action, as well as Calcium and Magnesium on Rose Shoot Rooting, Shoot-tip Necrosis and Leaf Senescence *in vitro*. Acta Physiologiae Plantarum 20, 1, 91–98.

Pöyhönen, P. 2010. Ruusun kuvat. 8.4.2010. Sähköposti. Vastaanottaja H. Pirttinen. Valokuvat ruusuista Sointu ja Tove Jansson sekä vuosilukutietoa ruusujen lisäyksestä MTT:lla.

Quoirin, M. & Lepoivre, P. 1977. Etude de milieux adaptes aux cultures in vitro de Prunus. Acta Horticulturae 78, 437–42.

Sallanon, H. & Maziere, Y. 1992. Influence of Growth Room and Vessel Humidity on the *in vitro* Development of Rose Plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 30, 121–125.

Skirvin, R. M. & Chu, M. C. 1979. In vitro Propagation of 'Forever Yours' Rose. HortScience 14, 5, 608–610.

Taiz, L. & Zeiger, E. 1991. Plant Physiology. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company.

Valles, M. & Boxus, Ph. 1987. Micropropagation of Several Rosa hybrida L. Cultivars. Acta Horticulturae 212, 611–617.

LIITTEET

Liite 1. Kirjallisuudesta etsityt alustat

TAULUKKO 1. Kirjallisuudesta etsityt lisäysalustat

| Lähde | Ravinne | Sytokiniinit [mg/l] | Auksiinit [mg/l] | Gibberelliini [mg/l] | Vitamiinit [mg/l] | Aktiivihiti | Muuta | Sokeri | Agar | Tulokset |
|-------|------------------------------|---|------------------------|-------------------------|--|-------------|---|----------------------|----------------|--|
| 1 | MS | BAP 1,0 | NAA 0,10 ja 0,15 | - | Samat kuin edellä | - | Glysiini | Sakkaroosi 30 g/l | 8 g/l | Rosa damascena ja R. cantina, vanhoja lajikkeita |
| 2 | Quoirin- Lepoivre | Koostumus sama kuin Liitteen 2. taulukossa + myo-inositoli 50 mg/l, foolihappo 0,1 mg/l ja p-aminobentsoehappo 1,0 mg/l | | | | | - | Sakkaroosi 30 g/l | 6 % Merck | ? |
| | Druart | BAP 1,0 | - | GA ₃ 0,2 | Käytetyistä vitamiineista ei tietoa | - | | ? | 6 % Merck | Lisääntyminen paranee |
| 3 | ½ MS | BAP 0,5 | IAA 0,1 | GA ₃ 10 | Myo-inos. 100, tiam. 0,5; nik. happo 1,0; pyridoks. 0,5 | - | pH 5,9 L-gluta- miinihappo 200 mg/l, Glysiini 4 mg/l | Sakkaroosi 1,5 % | Agar 0,6 % | Miniruusut, tutkittu etyleenin vaikutusta, AVG vähentää etyleenin tuotantoa |
| 4 | WPM ilman Cl ⁻ | - | - | - | Ei mainittu | - | - | Ei mainittu | Ei mainittu | Vähemmän vesittymistä, ruusulajikkeita ei mainittu erikseen |

Taulukossa mainitut lähteet:

1. Lähdeä ei tiedossa

2. Valles, M. & Boxus, Ph. 1987. Micropropagation of Several Rosa hybrida L. Cultivars. Acta Horticulturae 212, 611-617.

3. De Proft, M.P., Van den Broek, G. & De Greef, J.A. 1987. Involvement of Ethylene on Senescence and Vitrification of *in vitro* Cultured Miniroses. Acta Horticulturae 212, 217-222.

4. George, E.F., Hall, M.A. & De Klerk, G-J. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1 The background. 3.p. The Netherlands: Springer. 348.

| Lähde | Ravinne | Sytokiniinit [mg/l] | Auksiinit [mg/l] | Gibberelliini [mg/l] | Vitamiinit [mg/l] | Aktiivihili | Muuta | Sokeri | Agar | Tulokset |
|-------|---------|------------------------|---------------------------------|---|--|--|------------------------------------|--------------------------------|---|---|
| 5 | MS | BAP 0,5 | NAA 0,1; IAA 0,1; IBA 0,1 | - | Myo- inosi-toli 100, nik. happo 0,5 | Versot rus- kettuivat, aktiivihili ei auttanut | Glysiini 2,0 mg/l | Sakkaroosi 3 % | Difco- agar 0,8 % | Rosa damascena - viljelmän aloitus |
| | MS | BAP 0,5 | IAA 0,1 | 0,1; 0,5; 1,0 ja 5,0 mg/l GA ₃ | Myo- inosi-toli 100, nik. happo 0,5 | - | Glysiini 2,0 mg/l pH 5,8 | Sakkaroosi 3 % | Difco- agar 0,8 % | Jälkisilmut, 35 % kasvu 0,1 mg/l IAA ja 0,5 mg/l BAP, GA ₃ paransi versoontumista |
| | ? | BAP 0,5 | IAA 0,1 | 0,1; 0,5; 1,0 ja 5,0 mg/l GA ₃ | Myo- inosi-toli 100, nik. happo 0,5 | - | - | Sakkaroosi 3 % | Neste- mäinen alusta | Parhaat tulokset: 1,0 mg/l ja 5,0 mg/l GA ₃ (90 %, 83,3 %) |
| 6 | MS | BAP 5,0 | - | 1,0 (0,1 tai 0,3) | Ks. taulukko 5. | - | - | Sakkaroosi 30 tai 40 g/l | Ei mainittu merkkiä eikä määrää | Korkea lisäätymisaste |
| | MS | BAP 3,0 | IAA 0,3 | - | Ks. taulukko 5. | - | 100 mg/l metyyli-lau- raatti | Ei mainittu | Ei mainittu | Met.laur. lisäyksellä versomäärä kasvoi paljon |

Taulukossa mainitut lähteet:

5. Macek, T. & Vaněk, T. 1994. Symposium: Plant Cell, Tissue and Organ Cultures In Liquid Media, Book of Abstracts. Prague. 92-94.

6. George, E.F., Hall, M.A. & De Klerk, G-J. 1993/1996. Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 2. In practice. 2.p. England: Exegetics. 947-950.

| Lähde | Ravinne | Sytokiniinit [mg/l] | Auksiinit [mg/l] | Gibberelliini [mg/l] | Vitamiinit [mg/l] | Aktiivihiiili | Muuta | Sokeri | Agar | Tulokset |
|-------|---------|------------------------|------------------------|-------------------------|--|---------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------------------|--|
| 8 | MS | BAP 6,67 µM | IBA 0,49 µM | GA ₃ 0,29 µM | Martin et al. 1981 | - | Glutamiini, pH 5,5-5,6 | Sakkaroosi 30 g/l | Touzzart & Matignon 8 g/l | Etyleenin vaikutus lisääntymiseen ja kasvuun |
| 9 | MS | BAP 6,6 µM | - | - | Ks. taulukko 5. | - | pH 5,5 | Sakkaroosi 87,7 mM/l | Bacto agar 7 g/l | Kasvatushuoneen ja -astian kosteu- den vaikutus ruusun kehityk- seen <i>in vitro</i> |
| 10 | MS | BAP 7,9 µM | - | GA ₃ 0,3 µM | Ks. taulukko 5. | - | Ph 5,6 | Glukoosi 30 g/l | Touzzart & Matignon 7,5 g/l | Vesiolosuhteet ja ruusun kasvu eri suhteellisissa kosteuksissa |
| 1 | MS | BAP 1,0; 3,0 tai 10 | IAA 0,3 | - | Inositoli 1000, tia- miini 0,5; nik. happo 0,5; pyridoks. 0,5 | - | Glysiini | Sakkaroosi 30 g/l | 8 g/l | 4 vk:n kuluttua keskimäärin 6 versoa/tupas |
| | MS | BAP 2,0 | NAA 0,05 ja 0,10 | - | Samat kuin edellä | - | Glysiini | Sakkaroosi 30 g/l | 8 g/l | Hybridin lisäys |

Taulukossa mainitut lähteet:

8. Kevers, C., Boyer, N., Courduroux, J-C & Gaspar, T. 1992. The Influence of Ethylene on Proliferation and Growth of Rose Shoot Cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28, 175-181.

9. Sallanon, H. & Maziere, Y. 1992. Influence of Growth Room and Vessel Humidity on the *in vitro* Development of Rose Plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30, 121-125.

10. Ghashghaie, J., Brenckmann, F. & Saugier, B. 1992. Water Relations and Growth of Rose Plants Cultured *in vitro* Under Various Relative Humidities. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30, 51-57.

TAULUKKO 2. Kirjallisuudesta etsityt juurrutusalusustat

| Lähde | Ravinne | Sytokiniiniit [mg/l] | Auksiniit [mg/l] | Gibberelliini [mg/l] | Vitamiinit [mg/l] | Aktiivihili | Muuta | Sokeri | Agar | Tulokset |
|-------|-------------------------|----------------------|-------------------------------------|----------------------|---|-------------|--------|-------------------|--------------------------------|--|
| 7 | MS full strength | Ei mainittu | Ei mainittu | Ei mainittu | Inositol 100 Tiamini-HCl 0,1; Nikotiini-happo 0,5 Pyridoks.-HCl 0,5 | - | pH 5,7 | Sakkaroosi 30 g/l | 0,8 % Sigma | Miniruusuja, 7 laj. ka. 78 % |
| | MSR ½ suolat | Ei mainittu | Ei mainittu | Ei mainittu | | - | pH 5,7 | Sakkaroosi 30 g/l | 0,8 % Sigma | Miniruusuja, 7 laj. ka. 90 % |
| | MSC full strength | Ei mainittu | Ei mainittu | Ei mainittu | | 1,0 g/l | pH 5,7 | Sakkaroosi 30 g/l | 0,8 % Sigma | Miniruusuja, 7 laj. ka. 92 % |
| | MSCR ½ suolat | Ei mainittu | Ei mainittu | Ei mainittu | | 1,0 g/l | pH 5,7 | Sakkaroosi 30 g/l | 0,8 % Sigma | Miniruusuja, 7 laj. ka. 97 % * |
| 2 | Druart ½ makroravinteet | - | IBA 3,0 | - | Druart ? | - | pH 5,5 | ? | 6,0 % Merck | Juur. 100 % lisäys- alustoilta jolla 1 mg/l BAP & 1 mg/l IBA |
| 1 | Low MS | - | NAA 0,03 tai 10,0 tai IAA 1,0 | - | Ks. taulukko 5. | - | - | Ei mainittu | Ei mainittu | 90-100 % juurtuminen |
| 6 | MS low salt | - | IBA 3,0 | - | Ks. taulukko 5. | - | - | Ei mainittu | Ei mainittu | Rosa hybrida |
| | MS low salt | BAP 1,0 | IBA 1,0 | - | Ks. taulukko 5. | - | - | Ei mainittu | Ei mainittu | 3 lajikkeen maksimijuurtuvuus |
| | WPM | - | IBA 0,2 | - | Ei mainittu | - | - | Sakkaroosi 20 g/l | - | Versot kasteltiin liuoksessa |
| | MS | - | NAA 0,5 | - | Ks. taulukko 5. | - | - | Sakkaroosi 60 g/l | - | Versoja viljeltiin 5 pv nesteessä |
| 11 | 1/4 MS | - | - | - | Syanokobalmiini 0,0015; foolihappo, ri- boflaviini ja p- aminobentsoe-happo 0,5; biotiini, kolini- kloridi, Ca- pantotenaatti ja Tiam. HCl 1,0; nikotiniamidi ja pyridoks.HCl 2,0 | - | pH 5,7 | Sakkaroosi 30 g/l | DiffCo-bacto agar 10 g/l | 68 % juurtuvuus, juurtusaika 3 viikkoa |

Taulukossa mainitut lähteet:

7. Badzian, T., Hennen, G.R. & Fotyma-Kern, J. 1991. *In vitro* Rooting of Clonal Propagated Miniature Rose Cultivars. Acta Horticulturae 289, 329-330.

2. Valles, M. & Boxus, Ph. 1987. Micropropagation of Several *Rosa hybrida* L. Cultivars. *Acta Horticulturae* 212, 611-617.

1. Lähdettä ei tiedossa

6. George, E.F., Hall, M.A. & De Klerk, G-J. 1993/1996. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Volume 2. In practice. 2.p. England: Exegetics. 947-950.

11. Skirvin, R. M. & Chu, M. C. 1979. In vitro Propagation of 'Forever Yours' Rose. *HortScience* 14, 5, 608-610.

Liite 2. Juurrutetut versot alustan ja ruusun mukaan

TAULUKKO 1. Juurrutetut versot, TTA-580 Williams' Double Yellow

| Alusta | Harmaa | Keltainen | Vihreä | Punainen | Musta | Valkoinen | Sininen | Raidallinen | Yht. |
|-------------|--------|-----------|--------|----------|-------|-----------|---------|-------------|------|
| Juurrutettu | 20 | 18 | 14 | 8 | 18 | 19 | 16 | 13 | 126 |
| Elossa | 20 | 14 | 8 | 2 | 2 | 3 | 2 | 0 | 51 |

TAULUKKO 2. Juurrutetut versot, TTA-601 Tove Jansson

| Alusta | Harmaa | Keltainen | Vihreä | Punainen | Musta | Valkoinen | Sininen | Raidallinen | Yht. |
|-------------|--------|-----------|--------|----------|-------|-----------|---------|-------------|------|
| Juurrutettu | 10 | 9 | 8 | 9 | 12 | 12 | 4 | 7 | 71 |
| Elossa | 6 | 0 | 4 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 14 |

TAULUKKO 3. Juurrutetut versot, TTA-603 Sointu

| Alusta | Harmaa | Keltainen | Vihreä | Punainen | Musta | Valkoinen | Sininen | Raidallinen | Yht. |
|-------------|--------|-----------|--------|----------|-------|-----------|---------|-------------|------|
| Juurrutettu | 12 | 6 | 6 | 8 | 114 | 38 | 48 | 49 | 281 |
| Elossa | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

TAULUKKO 4. Juurrutetut versot alustan mukaan

| Alusta | Harmaa | Keltainen | Vihreä | Punainen | Musta | Valk. | Sininen | Raidal. | Yht. |
|----------|--------|-----------|--------|----------|-------|-------|---------|---------|------|
| TTA-580 | 20 | 18 | 14 | 8 | 18 | 19 | 16 | 13 | 126 |
| TTA-601 | 10 | 9 | 8 | 9 | 12 | 12 | 4 | 7 | 71 |
| TTA-603 | 12 | 6 | 6 | 8 | 114 | 38 | 48 | 49 | 281 |
| yhteensä | 42 | 33 | 28 | 25 | 144 | 69 | 68 | 69 | 478 |

Liite 3. Juurrutusalustan koostumus

| | Aine | Pitoisuus alustassa |
|---------------------|---------------|---------------------|
| Sokeri: | Sakkaroosi | 30 g/l |
| Hormoni: | IAA | 2,0 mg/l |
| Vitamiini: | Myo-inositoli | 50 mg/l |
| Muut aineet: | Rauta | 3,9 mg/l |
| | Agar | 8 g/l |
| | Bacto Peptone | 0,27 g/l |

Juurrutusalustat keitettiin kahdessa osassa Soinnun välikasvatuksen takia.

Williams' Double Yellow'lle (TTA-580) ja Tove Janssonille (TTA-601) keitettiin 3,0 litraa alustaa ja myöhemmin Soinnulle (TTA-603) 2,0 litraa.

Liite 4. Murashige-Skoog (MS)-alustan koostumus

| Makroravinteet | Pitoisuus [mg/l] | Mikroravinteet | Pitoisuus [mg/l] | Vitamiinit | Pitoisuus [mg/l] |
|--|---------------------|--|---------------------|------------------|---------------------|
| KNO ₃ | 1900 | MnSO ₄ * 4 H ₂ O | 22,3 | Inositoli | 100 |
| NH ₄ NO ₃ | 1650 | ZnSO ₄ * 7 H ₂ O | 8,6 | Tiamiini-HCl | 0,1 |
| CaCl ₂ * 2 H ₂ O | 440 | H ₃ BO ₃ | 6,2 | Nikotiinihappo | 0,5 |
| MgSO ₄ * 7 H ₂ O | 370 | KI | 0,83 | Pyridoksiini-HCl | 0,5 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 | CuSO ₄ * 5 H ₂ O | 0,025 | | |
| | | Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O | 0,25 | | |
| | | CoCl ₂ * 6 H ₂ O | 0,025 | | |
| | | FeSO ₄ * 7 H ₂ O | 27,85 | | |
| | | Na ₂ EDTA * 2 H ₂ O | 37,25 | | |

MS -alustan koostumus vuodelta 1962. Alustaan on usein lisätty myös 2,0 mg/l glysiiniä.

Liite 5. Kartat koeasetelmista ruusuittain

Sointu TTA-603

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 15 | 11 | 20 | 14 | 16 | 1 | 14 | 4 | 18 | 13 | 19 | 10 | 20 | 11 | 2 | 20 | 18 | 9 | 16 | 15 |
| 9 | 8 | 16 | 8 | 11 | 18 | 13 | 16 | 8 | 9 | 15 | 2 | 17 | 10 | 18 | 4 | 1 | 4 | 19 | 11 |
| 1 | 19 | 4 | 12 | 4 | 3 | 3 | 13 | 18 | 14 | 4 | 6 | 7 | 19 | 5 | 4 | 7 | 6 | 12 | 20 |
| 10 | 8 | 19 | 12 | 19 | 20 | 13 | 17 | 5 | 6 | 8 | 2 | 5 | 17 | 2 | 3 | 12 | 13 | 8 | 14 |
| 8 | 16 | 18 | 10 | 9 | 5 | 1 | 12 | 9 | 1 | 7 | 10 | 15 | 14 | 17 | 9 | 16 | 3 | 8 | 20 |
| 10 | 1 | 7 | 7 | 3 | 7 | 1 | 11 | 7 | 5 | 10 | 11 | 17 | 20 | 3 | 2 | 13 | 14 | 11 | 17 |
| 13 | 9 | 15 | 17 | 2 | 14 | 4 | 12 | 6 | 16 | 6 | 7 | 13 | 9 | 16 | 3 | 19 | 19 | 2 | 15 |
| 11 | 20 | 3 | 12 | 17 | 18 | 6 | 1 | 14 | 10 | 12 | 5 | 2 | 18 | 6 | 15 | 6 | 15 | 5 | 5 |

KUVIO 1. Paikkakartta, Sointu TTA-603

Kaikissa paikkakartoissa alkuperäisten käsin piirrettyjen karttojen mustaa alustaa vastaa violetti väri ja ruskeaa (raidallinen alusta) vaaleanpunainen.

Tove Jansson TTA-601

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1 | 11 | 6 | 10 | 2 | 10 | 18 | 6 | 15 | 11 | 14 | 20 | 2 | 14 | 13 | 17 | 16 | 4 | 11 | 15 |
| 13 | 15 | 3 | 20 | 15 | 19 | 5 | 18 | 2 | 16 | 3 | 16 | 19 | 10 | 14 | 8 | 4 | 15 | 14 | 16 |
| 9 | 5 | 7 | 16 | 18 | 4 | 18 | 18 | 13 | 6 | 20 | 5 | 11 | 6 | 12 | 17 | 13 | 17 | 7 | 3 |
| 12 | 17 | 7 | 4 | 19 | 11 | 20 | 20 | 8 | 5 | 17 | 17 | 4 | 10 | 10 | 2 | 13 | 6 | 6 | 15 |
| 18 | 5 | 18 | 3 | 12 | 19 | 9 | 7 | 3 | 14 | 11 | 17 | 12 | 1 | 20 | 7 | 9 | 5 | 12 | 1 |
| 2 | 16 | 8 | 11 | 19 | 1 | 19 | 3 | 12 | 1 | 12 | 8 | 20 | 8 | 10 | 19 | 10 | 4 | 1 | 12 |
| 10 | 14 | 8 | 2 | 11 | 9 | 6 | 13 | 4 | 7 | 14 | 6 | 17 | 9 | 15 | 13 | 20 | 7 | 3 | 8 |
| 1 | 3 | 13 | 5 | 14 | 16 | 9 | 8 | 7 | 18 | 9 | 5 | 2 | 1 | 16 | 2 | 4 | 9 | 15 | 19 |

KUVIO 2. Paikkakartta, Tove Jansson TTA-601

Williams Double Yellow TTA-580

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 10 | 19 | 19 | 13 | 14 | 8 | 5 | 16 | 10 | 17 | 5 | 7 | 17 | 15 | 17 | 14 | 18 | 8 | 4 | 2 |
| 6 | 14 | 15 | 8 | 10 | 18 | 20 | 15 | 20 | 13 | 18 | 9 | 12 | 2 | 3 | 5 | 12 | 1 | 3 | 18 |
| 19 | 20 | 13 | 20 | 7 | 12 | 6 | 18 | 20 | 11 | 16 | 3 | 13 | 4 | 19 | 6 | 17 | 6 | 1 | 14 |
| 19 | 5 | 17 | 15 | 1 | 19 | 13 | 2 | 6 | 2 | 18 | 4 | 16 | 17 | 15 | 7 | 4 | 6 | 11 | 2 |
| 3 | 1 | 11 | 10 | 16 | 20 | 11 | 13 | 4 | 8 | 7 | 2 | 7 | 16 | 16 | 17 | 12 | 14 | 13 | 12 |
| 6 | 6 | 12 | 9 | 3 | 5 | 8 | 3 | 5 | 4 | 15 | 7 | 14 | 3 | 15 | 17 | 7 | 19 | 2 | 5 |
| 16 | 10 | 14 | 18 | 8 | 12 | 1 | 9 | 11 | 9 | 14 | 10 | 9 | 4 | 16 | 2 | 13 | 10 | 1 | 15 |
| 1 | 4 | 11 | 9 | 5 | 18 | 8 | 20 | 11 | 3 | 10 | 8 | 11 | 12 | 9 | 20 | 9 | 7 | 1 | 19 |

KUVIO 3. Paikkakartta, Williams' Double Yellow TTA-580

Liite 6. Reagenssit

| Reagenssi | Valmistaja | Puhtaus | M [g/mol] | Muuta |
|--|----------------|---------------------------|-----------|--|
| KNO ₃ | J.T. Baker | Baker analyzed (ba) | 101,11 | Lot: B47155, UN 1486 |
| NH ₄ NO ₃ | J.T. Baker | ba | 80,04 | Lot: 0703101016, UN 1942 |
| Ca(NO ₃) ₂ * 4 H ₂ O | J.T. Baker | ba | 236,15 | Lot: 0514301003, UN 1454 |
| MgSO ₄ * 7 H ₂ O | J.T. Baker | ba | 246,47 | Lot: 0804301003 |
| KH ₂ PO ₄ | J.T. Baker | ba | 136,09 | Lot: B36166 |
| MnSO ₄ * 4 H ₂ O | BDH | AnalaR | 223,06 | Lot: A359906 336, UN 3077 |
| ZnSO ₄ * 7 H ₂ O | J.T. Baker | ba | 287,54 | Lot: 0729601040 |
| H ₃ BO ₃ | Riedel-de Haën | Für analyse | 61,83 | Charge lot: 90160 |
| KI | Merck | Pro analysi | 166,01 | 5043.0250 235, B447643 |
| CuSO ₄ * 5 H ₂ O | J.T. Baker | ba | 249,68 | Lot: 0622301001, UN 3077 |
| Gibberellic acid | Sigma | Plant cell culture tested | 346,38 | (GA ₃ minimum of 90 % of total gibberellins) G7645-5G, 106K1316 |
| Agar agar hochrein | Merck | Für die Mikrobiologie | - | 86500588 |
| 6-Benzylaminopurine | Sigma | Plant cell culture tested | - | CAS: 1214-39-7 |
| Riboflavin (Vitamin B ₂) | Sigma | Plant cell culture tested | - | Lot: 16F-021-625 |
| d-Biotin (Vitamin H) | Sigma | Plant cell culture tested | - | Approx. 99 % TLC, Lot: 068H137425, [58-85-5] |
| Calciumpanthothenate | Sigma | Meets USP specifications | - | Lot: 087H1134, [137-08-6] |
| Thiamine HCl | Sigma | Plant cell culture tested | - | CAS 67-03-8, 023K0007 |
| Nicotinic acid | Sigma | Plant cell culture tested | - | Niacin; Pyridine-3-carboxylic acid Lot: 90H-069525 |
| 3-indoleacetic acid | Sigma | Plant cell culture tested | - | CAS 87-51-4 |
| Ethylenediaminetetraacetic acid Iron (III)-sodium salt hydrate | Fluka | Purum: 12-14 % Fe | - | Lot: 1248082 |